

110年度檢驗技術教育訓練

腸炎弧菌之分離與計數

研究檢驗組 食品生物科
葉民煉 技士

時間: 110年09月16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

- 認識腸炎弧菌
- 食品中微生物衛生標準之限量
- 腸炎弧菌之檢驗方法
 - 配製稀釋液、培養基
 - 調製檢液及增菌培養
 - 分離培養
 - 生化試驗、抗血清試驗
 - 檢驗結果判定
 - 最確數(MPN)計數

認識腸炎弧菌

腸炎弧菌之食品中毒案

□ 食品中毒案例，最早發生於日本大阪(1950年)。腸炎弧菌會產生3種以上溶血物質，故又稱為副溶血性弧菌，存在於溫暖的沿海地區，適宜生長環境下(30~37°C)繁殖速度很快，可在12~18分鐘繁殖1倍。目前腸炎弧菌造成的食品中毒發生率在台灣排名第一。

□ 菌種特性

- 1.革蘭氏陰性弧菌。
- 2.菌體一端具鞭毛，活動性強。
- 3.兼性厭氧菌。
- 4.無法產生芽胞。
- 5.對酸敏感，生長pH值為5~9。
- 6.具嗜鹽性，2~5%食鹽溶液生長情形良好。
- 7.適合的生長溫度為10~42°C，而以30~37°C生長情形最佳。
- 8.在環境適宜的食品中，每10~12分鐘即可增殖1倍。

□ 發生原因

- 1.中毒的原因食品主要為生鮮海產、魚貝類、或受其污染的其他食品。
- 2.亦可透過菜刀、砧板、抹布、器具、容器及手等媒介物間接污染食物而引起中毒。
- 3.食物只要經少量的腸炎弧菌污染，在適當條件下，短時間內即可達到致病菌量，增殖迅速是造成食品中毒的一大原因。

□ 潛伏期：4~90小時(平均約17小時)。

□ 中毒症狀

- 1.主要症狀為噁心、嘔吐、腹痛、水樣腹瀉、頭痛、發燒、發冷。
- 2.死亡率在0.1%以下。

□ 治療方法：症狀輕微可在2~3天內自然痊癒；重症時需補充水分及電解質，以防脫水，並給予抗生素治療。

腸炎弧菌之食品中毒案

□ 如何預防

1. 腸炎弧菌嗜鹽，生鮮魚貝類可用自來水充分清洗去除此菌。
2. 腸炎弧菌對低溫極敏感，在10°C以下不但不生長且易致死，可用低溫冷藏方法防止繁殖。
3. 生鮮及熟食所使用之容器、刀具、砧板應分開，勿混合使用。避免二次污染，手、抹布、砧板和廚房器具於接觸生鮮海產後應用清水澈底洗淨。
4. 本菌不耐熱，在60°C經15分鐘即易被殺滅，故在食用前充分加熱煮熟是最好的預防方法，絕對避免生食。
5. 煮熟的食物必須保存於夠高的溫度(至少需高於60°C)，否則即需迅速冷藏至7°C 以下，以抑制腸炎弧菌的生長。
6. 生鮮與熟食不宜存放在同一冰箱或儲藏櫃，若不得已，須存於同一地點，熟食也應覆蓋完整並放在上層，以免遭受生鮮食品的污染。
7. 腸炎弧菌食品中毒只要遵守清潔、加熱、冷藏三個大原則，幾乎可完全防止。海鮮食品鮮美營養，人人嗜食，但應注意其處理方法。

腸炎弧菌之食品中毒案

84年腸炎弧菌引起之最大規模集體食品中毒事件

□ 台北縣市七所國民小學和公司行號，1,706人發病，1,010 人就醫

□ 檢驗結果：

1.人體檢體：

(a)預研所：41.2% (77/187)檢出K12 型腸炎弧菌，另4.3% (8/187)同時檢出金黃色葡萄球菌 (A 型：3件、B 型：1件、C 型：4件)

(b)馬偕醫院：25% (8/32)檢出腸炎弧菌

2.食餘檢體：腸炎弧菌(O10型)、仙人掌桿菌和金黃色葡萄球菌(非產腸毒素型)，如下表

3.環境檢體：廚房器皿10 件及環境4 件均未檢出病原菌

表二 台北縣三芝國小學校午餐食餘物檢體的檢驗結果

檢體名稱	腸炎弧菌 (CFU/克)	仙人掌桿 菌(CFU/克)	金黃色葡萄球 菌(CFU/克) / 腸毒素型	沙門氏桿菌	病原性大腸 桿菌/血清型	金黃色葡萄 球菌腸毒素
香 菇 肉絲麵	陽性 $< 1.0 \times 10^2$	陰性	陽性/未檢出 $< 1.3 \times 10^2$	陰性	陰性	未檢出
鹹酥雞丁	陽性 $< 1.0 \times 10^2$	陽性 $< 9.5 \times 10^4$	陽性/未檢出 $< 4.2 \times 10^3$	陰性	陰性	未檢出
木耳三絲	陽性 $< 1.0 \times 10^3$	陽性 $< 3.5 \times 10^4$	陽性/未檢出 $< 2.7 \times 10^3$	陰性	陰性	未檢出
荷包蛋	陽性 $< 1.5 \times 10^3$	陽性 $< 1.4 \times 10^5$	陽性/未檢出 $< 4.2 \times 10^4$	陰性	陰性	未檢出

(疫情報導，1996年第12卷第9期)



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

腸炎弧菌之食品中毒案件統計

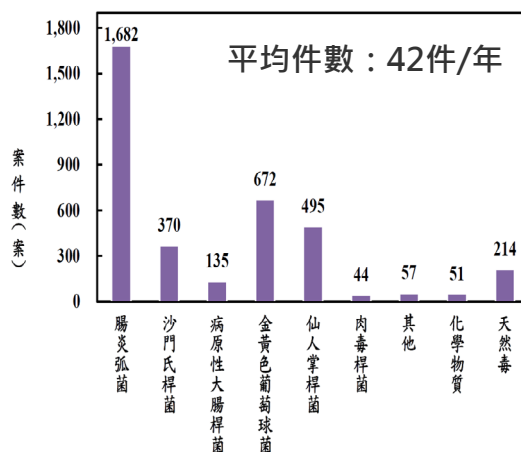
表二：食品中毒案件病因物質分類統計表（民國 109 年） 單位：案，人				
病因物質		案件數	患者數	死者數
總計		506	4,920	0
病因物質判明合計 ¹		202	2,987	0
細菌	小計 ²	80	1,464	0
	腸炎弧菌	18	188	0
	沙門氏桿菌	26	484	0
	病原性大腸桿菌	1	2	0
	金黃色葡萄球菌	17	391	0
	仙人掌桿菌	22	561	0
	肉毒桿菌	1	1	0
	其他	0	0	0
化學物質	小計	0	0	0
	農藥	0	0	0
	重金屬	0	0	0
	其他	0	0	0
天然毒	小計	10	41	0
	植物性	4	13	0
	麻痺性貝毒	0	0	0
	河豚毒	2	4	0
	組織胺	4	24	0
	黴菌毒素	0	0	0
	其他	0	0	0
其他 病因物質	小計	122	1,622	0
	諾羅病毒	121	1,618	0
	輪狀病毒	1	4	0
病因物質不明合計		304	1,933	0

¹ 病因物質判明合計，為扣除重複計數之值，細菌與病毒共同引起之案件共有 10 案，患者數共 140 人。

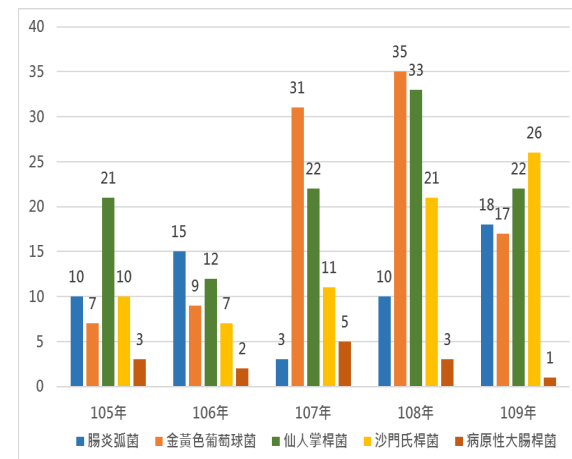
² 細菌之小計，為扣除重複計數之值，2 種細菌共同引起之案件共有 5 案，患者數共 163 人。

¹ 病因物質判明合計，為扣除重複計數之值，細菌與病毒共同引起之案件共有 10 案，患者數共 140 人。

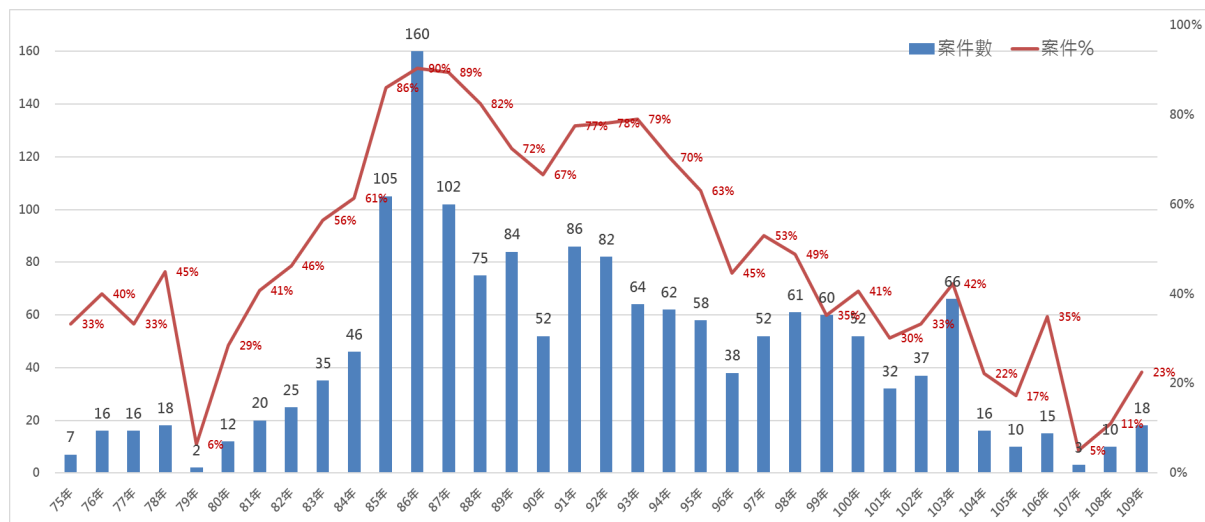
² 細菌之小計，為扣除重複計數之值，2 種細菌共同引起之案件共有 5 案，患者數共 163 人。



圖二、民國 70 年至 109 年食品中毒案件病因物質(不含病毒)判明案件數總計



105~109年食品中毒案件數統計表(細菌)



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限量

「食品中微生物衛生標準」正式公告

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

食品中腸炎弧菌之限量標準

食品類別	食品品項	限量標準
3.生鮮即食食品 ^a 及生熟食混和即食食品類 ^b	3.1生鮮即食水產品 3.2混和生鮮即食水產品之生熟食混和即食食品	100 MPN/g
5.冷凍食品及冰類	5.5供生食之冷凍生鮮水產品	100 MPN/g
	5.6經加熱煮熟 ^c 後再冷凍之水產品，僅需解凍或復熱即可食用者	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「加熱煮熟」係指產品加熱之條件足可確保產品能供即食。

食品中微生物衛生標準 Q&A



請輸入關鍵字 站台 站外 搜尋 進階搜尋

熱門關鍵字：食品添加物 營養標示 非登不可 基因改造

公告資訊 機關介紹 業務專區 法規資訊 便民服務 出版品 政府資訊公開 個人化服務

目前位置：首頁 > 公告資訊 > 本署公告

公告資訊

本署公告

發布訂定「食品中微生物衛生標準」【發布日期：2020-10-06】

發布日期：中華民國109年10月6日

發文字號：衛授食字第1091302247號令

本標準將自中華民國110年7月1日起實施，檢附發布令、總說明、條文對照表及相關Q&A如附供參。



檔案下載

- 發布令
- 總說明
- 逐條說明
- Q&A



食品中微生物衛生標準 Q&A

109年10月6日公布

說明：本 Q&A 係針對「食品中微生物衛生標準」(以下均簡稱本標準)之相關適用疑義補充說明，僅供參考，且將隨時視需求滾動更新。如仍有適用疑義，應經個案進行判定及確認。

1. 整合性問題

Q1-2.附表備註7，大腸桿菌如陰性，得不用加驗大腸桿菌O157:H7，其樣品檢體之前處理時機為何？

Q1-4.附表備註9，有關「**加熱煮熟**」之定義？

Q1-7.如果腸桿菌科檢驗為陰性，是否即可不用進行沙門氏菌或其他腸內菌之檢驗？

2. 標準適用分類疑義

Q2-5.附表備註6所指『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**，從嚴合併適用混合生食種類規範之微生物項目』，所指產品類型為何？

3. 名詞定義類

Q3-2.附表第3類所指之「**水產品**」定義及範圍？

Q3-4.附表第6類所指之「其他即食食品類」定義及範圍？



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

<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=26445>

食品中微生物衛生標準 Q&A

Q1-4. 「加熱煮熟」之定義及實務應用原則？

- 「加熱煮熟」之定義，係指產品**加工之條件**可確保產品能**安全的供即食者**。因不同食物加熱(烹飪)至可安全食用之條件不同，應以確保食物之**加熱條件**足以殺死可能導致食品中毒之**病原菌**為主，可以透過食物溫度計測試或感官目視等方式進行確認。
- 美國農業部(USDA)所提出之「**最低安全烹飪溫度表**(Safe Minimum Cooking Temperatures Charts)」供參考
- 所稱「煮熟」，並未限制其熟度，亦非僅指「全熟」，除依上開烹飪溫度所對應之產品狀態判定之外，部分僅提供短時間加熱後即供為食用之產品，例如：**三分熟牛排、炙燒/煙燻鮭魚**，該等產品亦通過加熱煮熟程序，非以生鮮狀態供食，僅加熱之程度及熟度不同，且該等加熱條件亦可確保產品能安全的供即食者，仍適用有關經「加熱煮熟」之規定。
- 進一步以牛肉為例，原塊分切之牛肉，於符合良好GHP之儲存條件下，未暴露於外界之肌肉內部尚屬無菌狀態，故僅針對肌肉外表使用高溫短時間之加熱方式以殺滅表面之微生物者(如：三分熟牛排)，仍屬經「加熱煮熟」，該等經加熱且供即食之產品仍可依本標準第6類之規定適用。

最低安全烹飪溫度表

(Safe Minimum Cooking Temperatures Charts)

食品	類別	中心溫度/感官檢查
絞肉及其製品	牛、豬、羊	160°F/71°C
	火雞、雞	165°F/74°C
生鮮之牛肉(取自成年牛隻cow之食用肉)、小牛肉(取自小牛calf之食用肉)、羊肉	肉排、肉捲(以料理繩將肉綁成一大塊或捲以利烘烤者)、肉絲 維持時間：3 分鐘	145°F/63°C
禽肉	所有之禽類，包括其胸肉、全禽肉、小腿、大腿肉、翅、絞肉、內臟及有填餡者	165°F/74°C
豬肉、火腿	生鮮豬肉，包括生鮮火腿 維持時間：3 分鐘	145°F/63°C
	熟火腿之復熱(經美國 USDA 查驗通過之工廠所包裝之熟火腿復熱至140°F)	165°F/74°C
蛋和含蛋的菜餚	蛋	煮至蛋黃和蛋白固化
	含蛋之菜餚(例如義式烘蛋/蛋餅、法式鹹派)	160°F/71°C
剩食和焗烤或燉煮者	剩食和焗烤或燉煮者	165°F/74°C
水產品	魚含鰭	145°F/63°C或煮至肉不透明 並用叉子輕易分離
	蝦、龍蝦、螃蟹和扇貝	煮至肉呈現珍珠色或白色且不透明
	蛤、牡蠣、貽貝(淡菜)	煮至殼打開

<https://www.foodsafety.gov/keep-food-safe/4-steps-to-food-safety>



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 Q&A

生熟食混和即食食品類之產品類型

Q2-5.『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，從嚴合併適用混合生食種類規範之微生物項目』，所指產品類型為何？

一、原則上，係指「生鮮即食水產品」、「生鮮即食蔬果」或「未全熟蛋」等不同類型之產品被「**混和**」，且**無法單獨分別取樣之情況**。例如：含有生魚片及生黃瓜之花卷壽司、含有未全熟蛋及生菜之三明治、含有生魚卵及生菜之手卷等類型之產品，其不同類型之食品已被混和或接觸者。

二、以**含有生魚片及生黃瓜之花卷壽司**為例，因同時涉及「3.2混和生鮮即食水產品之生熟食混合即食食品」及「3.3生鮮即食蔬果」，則兩類所涉之微生物(大腸桿菌、大腸桿菌O157:H7、沙門氏菌、腸炎弧菌及單核球增多性李斯特菌)均為應檢測項目。

3. 生鮮即食食品 ⁵ 及生熟食混和即食食品類 ⁶		
食品品項	微生物及其毒素、代謝產物	限量
3.1 生鮮即食水產品 3.2 混和生鮮即食水產品之生熟食混和即食食品	沙門氏菌	陰性
	腸炎弧菌	100 MPN/g
	單核球增多性李斯特菌	陰性
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 ⁷	陰性
	沙門氏菌	陰性
3.5 供即食之未全熟蛋及含有未全熟蛋之即食食品	單核球增多性李斯特菌	陰性
	沙門氏菌	陰性

Food category	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
3.2			✓	✓	✓
3.3	✓	✓	✓	✓	

<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=26445>



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

腸炎弧菌之檢驗方法

食品微生物之檢驗方法 - 腸炎弧菌之檢驗

106.4.27公告修正←新增 real-time PCR

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國106年4月27日
發文字號：衛授食字第1061900803號
附件：檢驗方法1份

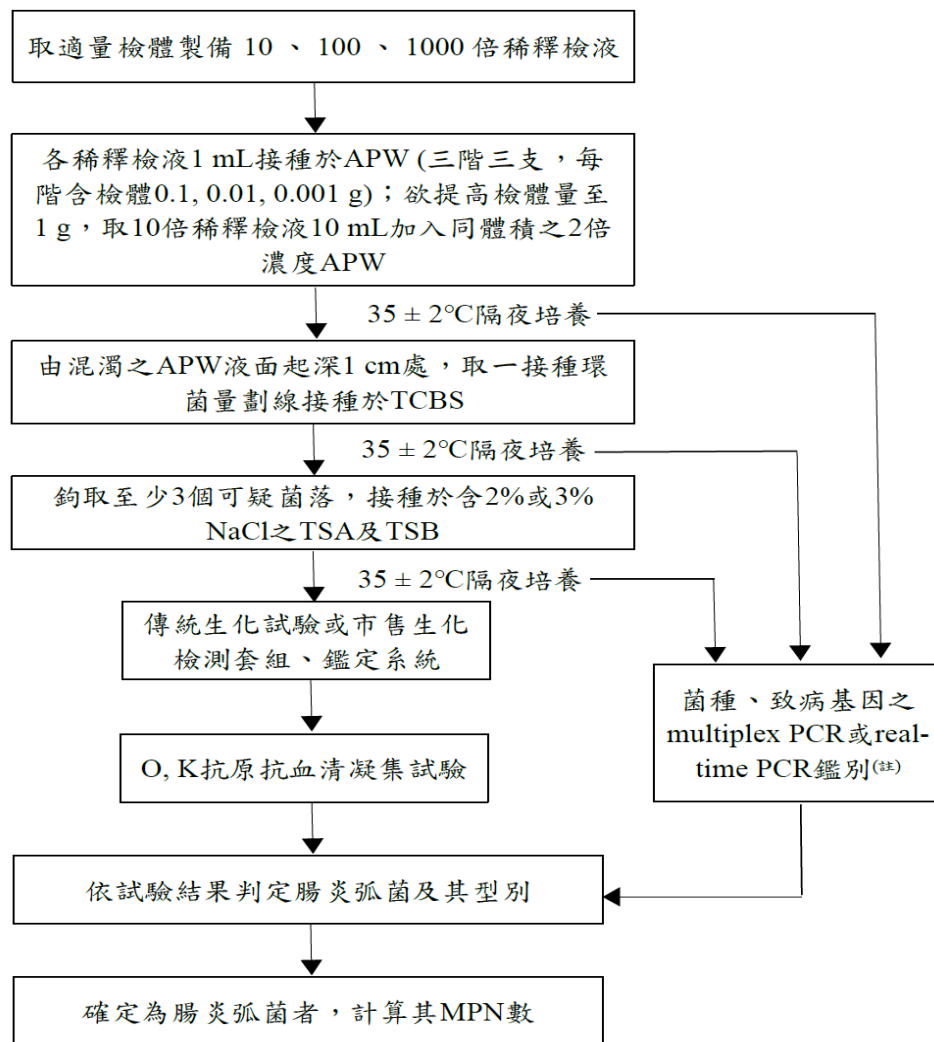


主旨：修正「食品微生物之檢驗方法－腸炎弧菌之檢驗 (MOHWM0011.02)」，並自即日起生效。

依據：食品安全衛生管理法第三十八條

公告事項：修正「食品微生物之檢驗方法－腸炎弧菌之檢驗 (MOHWM0011.02)」

部長陳時中



腸炎弧菌之檢驗方法

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

稀釋液、培養基及培養液

- ✓ 磷酸緩衝食鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)
- ✓ 鹼性蛋白胨水(Alkaline peptone water, APW)
- ✓ 硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基(Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)
- ✓ 胰化酪蛋白大豆鹽類培養基(Trypticase soy agar, TSA-2%或3%NaCl)
- ✓ 胰化酪蛋白大豆鹽類培養液(Trypticase soy broth, TSB-2%或3%NaCl)
- ✓ 精胺酸葡萄糖斜面培養基(Arginine-glucose slant, AGS)
- ✓ 三糖鐵培養基(Triple sugar iron agar, TSI)
- ✓ 運動性試驗培養基(Motility test medium, MTM)
- ✓ 動物膠培養基(Gelatin agar, GA)
- ✓ 動物膠鹽類培養基(Gelatin salt agar, GS)
- ✓ Hugh-Leifson葡萄糖培養液(Hugh-Leifson glucose broth, HLGB)
- ✓ 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)：精胺酸、離胺酸、鳥胺酸
- ✓ 胰化酪蛋白鹽化培養液(Tryptone salt broth, TN)： T_1N_0 , T_1N_6 , T_1N_8 , T_1N_{10}
- ✓ MR-VP培養液(MR-VP broth)
- ✓ 溴甲酚紫培養液(Bromcresol purple broth)：甘露糖、乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露糖醇
- ✓ Wagatsuma培養基(Wagatsuma agar)
- ✓ 長期保存培養基(Long-term preservation medium)→菌種保存
- ~~✓ 鹼性蛋白胨鹽類培養液(Alkaline peptone salt broth, APS)~~

鹼性蛋白胨水(Alkaline peptone water, APW)

組成分	克數	功能
蛋白胨(peptone)	10 g	提供微生物生長所需之氨基酸及其他複合含氮物質
氯化鈉(NaCl)	10 g	維持滲透壓
蒸餾水	1000 mL	

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

- ❑ Alkaline Peptone Water is recommended as an enrichment medium when analyzing food samples for *Vibrio*.
- ❑ The relatively **high pH** of the medium (approximately 8.4) provides a favorable environment for the growth of **vibrios**.

硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基 (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)

組成分	克數	功能
酵母抽出物(yeast extract)	5 g	微生物生長所需之營養源
蛋白胨(peptone)	10 g	微生物生長所需之營養源
蔗糖(sucrose)	20 g	弧菌代謝糖類發酵產酸(Postive→黃色 Negative→綠色)
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10 g	硫源、抑制腸桿菌科、偵測 H_2S 的產生
檸檬酸鐵(ferric citrate)	1 g	此與硫代硫酸鈉反應，形成黑色之硫化鐵沉澱物
膽酸鈉(sodium cholate)	3 g	抑制腸球菌等革蘭氏陽性菌、大腸桿菌群
牛膽汁(oxgall)	5 g	抑制腸球菌等革蘭氏陽性菌、大腸桿菌群
檸檬酸鈉(sodium citrate·2H ₂ O)	10 g	抑制腸桿菌科
氯化鈉(NaCl)	10 g	維持滲透壓
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.04 g	pH指示劑(6.0 ↔ 7.6)
麝香草藍(thymol blue)	0.04 g	pH指示劑(1.2 ↔ 2.8~8.0 ↔ 9.6)
洋菜(agar)	15 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

➢ 加熱溶解(不可高壓滅菌)，冷卻至50°C時，注入培養皿，放置隔夜或使用前以37 ~ 45°C乾燥，最終pH值為8.6±0.2。

Performance testing of TCBS

Function	Incubation	Control strains	WDCM ^a	Method of control	Criteria ^e	Characteristic reactions
Productivity	37 °C ± 1 °C for 24 h ± 3 h	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	00185 ^b	Qualitative	Good growth (2)	Green colonies (sucrose negative)
	37 °C ± 1 °C for 24 h ± 3 h	<i>Vibrio furnissii</i>	00186 ^b	Qualitative	Good growth (2)	Yellow colonies (sucrose positive)
Selectivity	37 °C ± 1 °C for 24 h ± 3 h	<i>Escherichia coli</i> ^{c d}	00012, 00013 or 00090	Qualitative	Total inhibition (0)	—

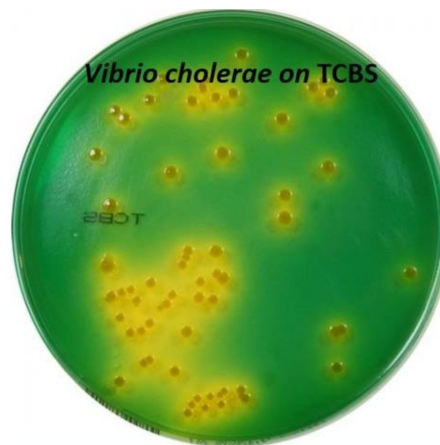
^a World Data Centre for Microorganisms (WDCM) strain catalogue available at <http://refs.wdcm.org>

^b Strain to be used as a minimum (see ISO 11133).

^c Some national restrictions and directions may require the use of a different *E. coli* serovar. Make reference to national requirements relating to the choice of *E. coli* serovars.

^d Strain free of choice; one of the strains shall be used as a minimum (see ISO 11133).

^e Growth is categorized as 0: no growth, 1: weak growth (partial inhibition), and 2: good growth (see ISO 11133).



Expected Results

Typical colonial morphology on TCBS Agar is as follows:

- V. cholerae* Large yellow colonies.
- V. parahaemolyticus* Colonies with blue to green centers.
- V. alginolyticus* Large yellow colonies.
- Proteus*/Enterococci Partial inhibition. If growth, colonies are small and yellow to translucent.
- Pseudomonas*/Aeromonas Partial inhibition. If growth, colonies are blue.



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

Performance testing of TCBS

Cultural Response

Cultural characteristics observed after an incubation at 35-37°C for 18-24 hours.

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Recovery	Colour of colony
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 (00126*)	$\geq 10^4$	inhibited	0%	
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 15748	50-100	good-luxuriant	$\geq 50\%$	yellow
<i>Vibrio fluvialis</i> ATCC 33809 (00137*)	50-100	good-luxuriant	$\geq 50\%$	yellow
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 (00037*)	50-100	good-luxuriant	$\geq 50\%$	bluish green
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 29307 (00187*)	50-100	fair-good	$\geq 30\%$	greenish yellow
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (00087*)	$\geq 10^4$	inhibited	0%	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (00013*)	$\geq 10^4$	inhibited	0%	
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	$\geq 10^4$	inhibited	0%	

Key : *Corresponding WDCM numbers.

User Quality Control

Identity Specifications

Difco™ TCBS Agar

Dehydrated Appearance: Light tan with greenish cast, free-flowing, homogeneous.

Solution: 8.9% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is forest green, very slightly opalescent.

Prepared Appearance: Green, slightly opalescent.

Reaction of 8.9% Solution at 25°C: pH 8.6 ± 0.2

Cultural Response

Difco™ TCBS Agar

Prepare the medium per label directions. Inoculate with fresh cultures (*E. coli* grown in TSB; vibrios grown in BHI) and incubate at 35 ± 2°C for 18-24 hours.

ORGANISM	ATCC™	RECOVERY	COLONY COLOR
<i>Escherichia coli</i>	25922	None	–
<i>Vibrio alginolyticus</i>	17749	Good	Yellow
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor	14033	Good	Yellow
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	Good	Blue green

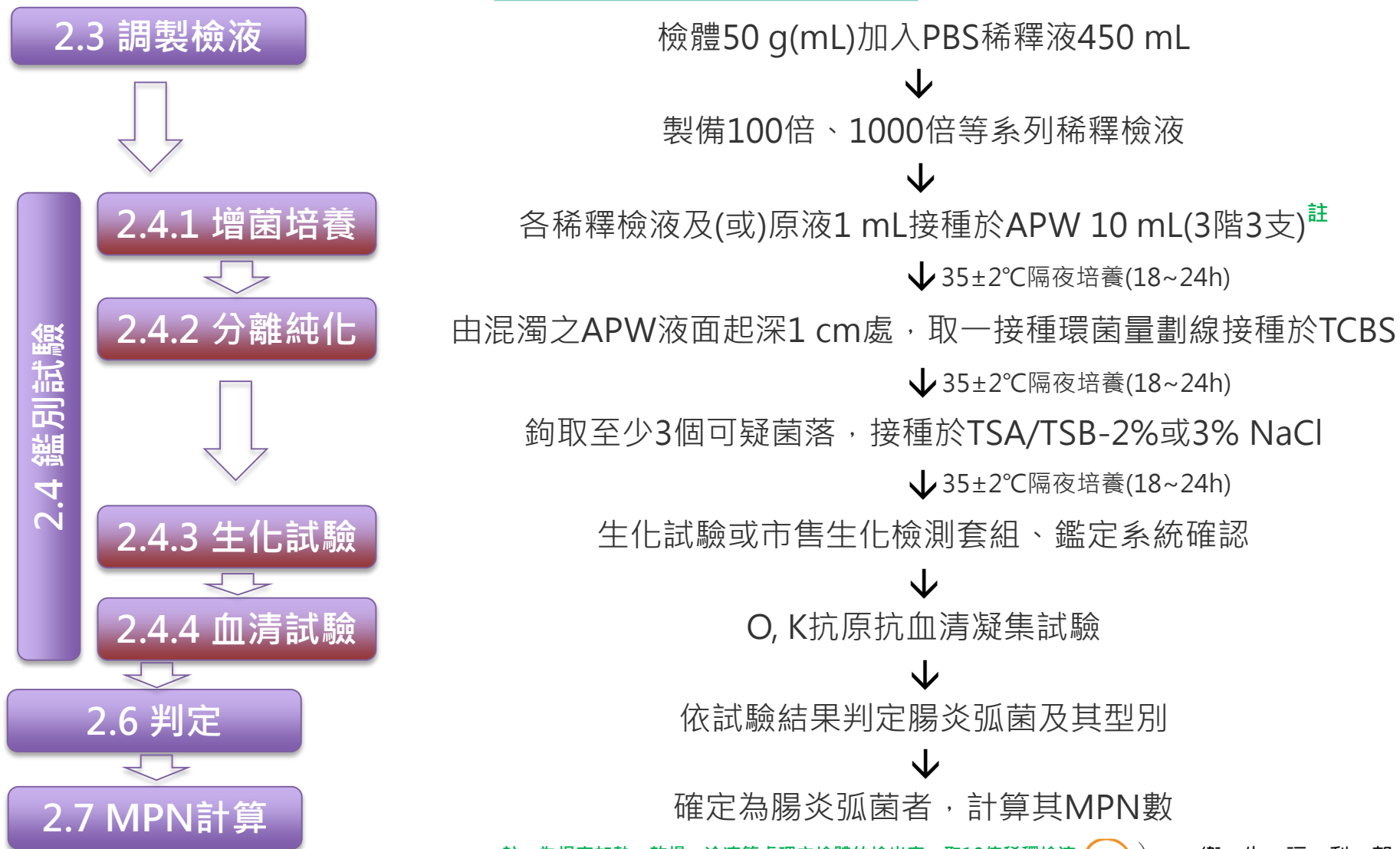
Test strains	Growth	Colour change to yellow
<i>Vibrio alginolyticus</i>	good / very good	+
<i>Vibrio cholerae</i> Inaba NIH 35	good / very good	+
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor Inaba CH 38	good / very good	+
<i>Vibrio cholerae</i> Ogawa NIH 41	good / very good	+
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor Ogawa CH 60	good / very good	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	good / very good	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	none / poor	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	none / poor	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14273	none / poor	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	none / poor	-

Appearance of Colonies	Microorganisms
Appearance of Colonies	Microorganisms
Flat, 2-3 mm in diameter, yellow	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio cholerae</i> type El Tor
Small, blue-green centre	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Large, yellow	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Blue	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> and others
Very small, translucent	Enterobacteriaceae and others



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

食品中腸炎弧菌之檢驗流程圖(MPN計數法)



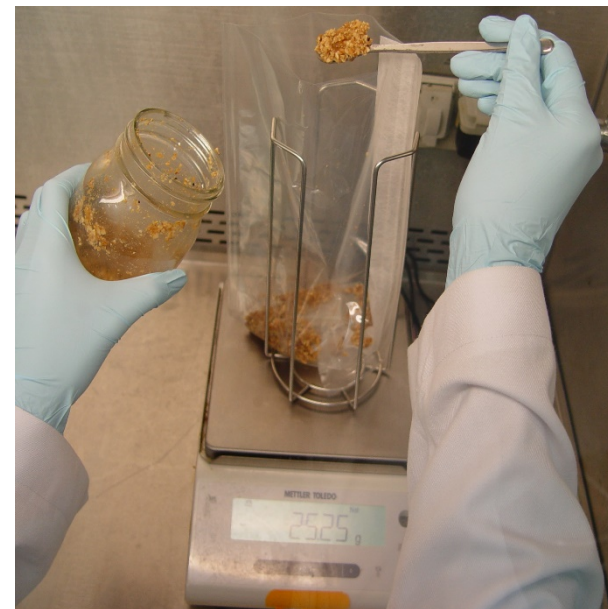
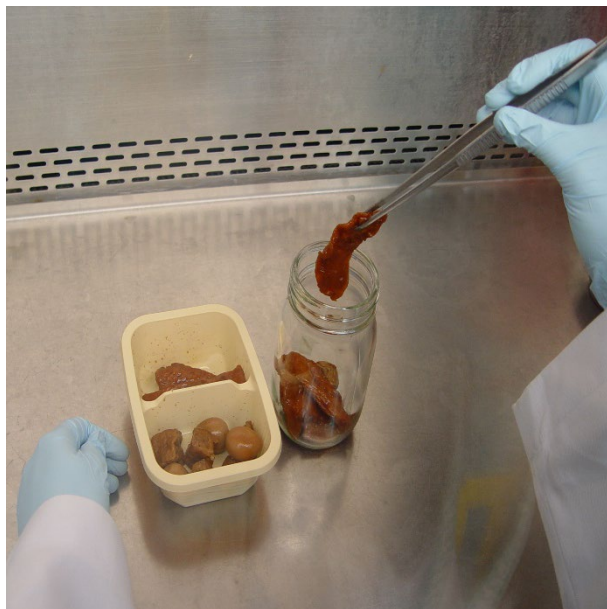
註：為提高加熱、乾燥、冷凍等處理之檢體的檢出率，取10倍稀釋檢液10 mL (檢體量=1 g)加入同體積之2倍濃度APW。



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

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



稱取檢體50 g (mL)

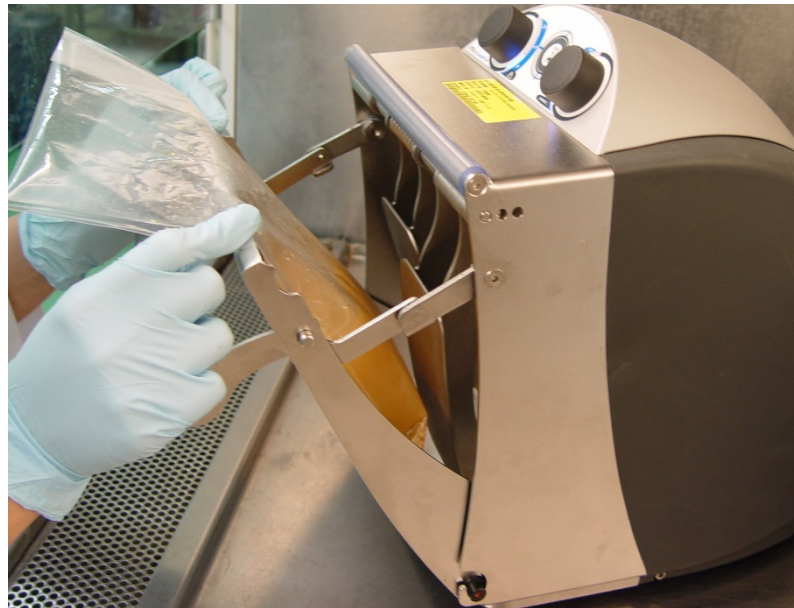
製備稀釋檢液(I)：10倍稀釋檢液



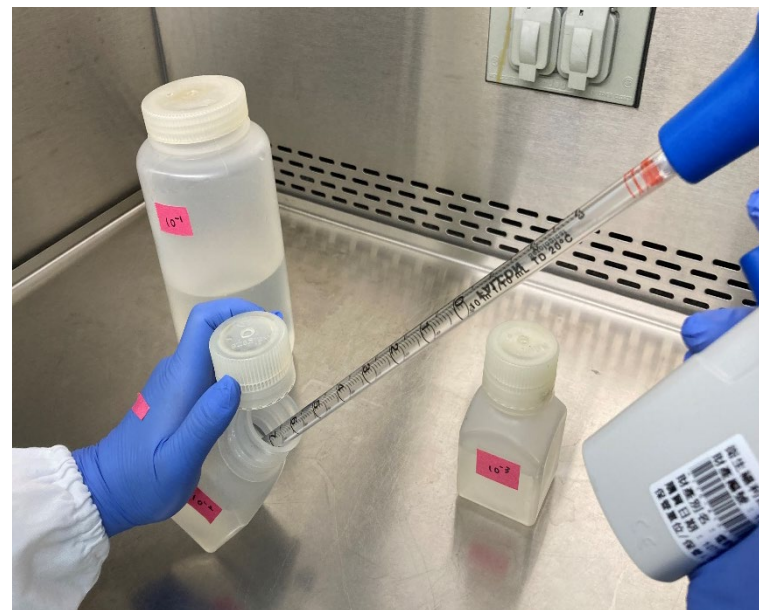
加入PBS稀釋液450 mL



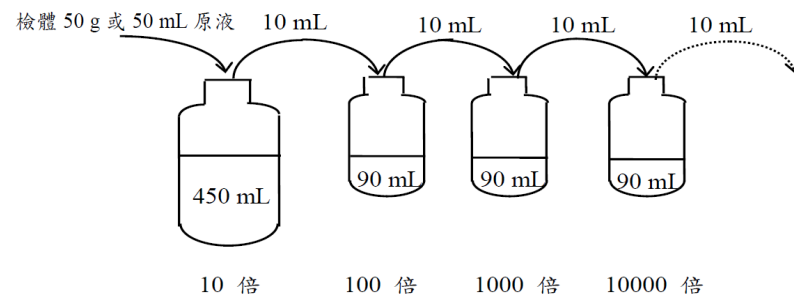
鐵胃(或攪拌均質機)混合均勻，
作成10倍稀釋檢液



製備稀釋檢液(II)： 10^n 系列稀釋檢液



製備100, 1000, 10000等系
列稀釋檢液(10 mL + 90 mL)



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

鑑別試驗

增菌培養

稀釋檢液及(或)原液1 mL → APW 10 mL(3階3支) → $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養

分離純化

- 鈎菌 → TCBS劃線培養($35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜) → 可疑菌落(圓弧形，呈綠色/藍綠色，直徑約2~3 mm)
- 可疑菌落 → 接種於TSA及TSB(含2%或3% NaCl) → $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養

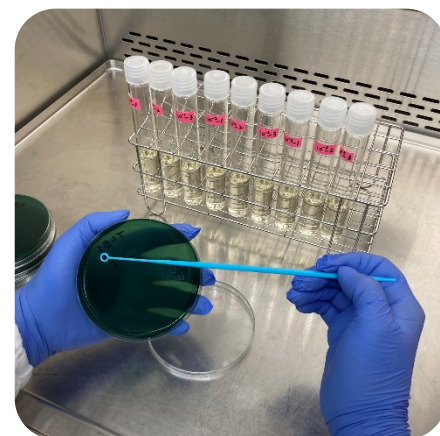
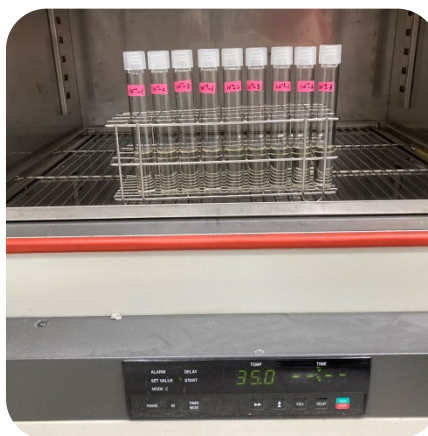
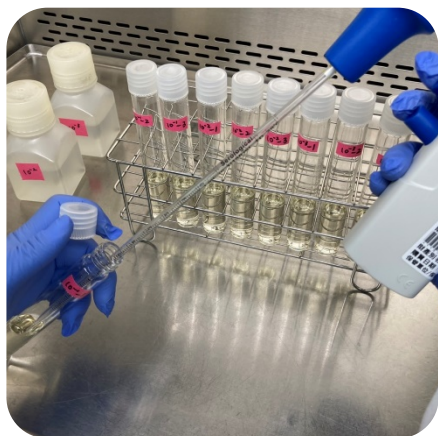
生化試驗

- 初步試驗：AGS、TSI、Gram stain、Motility、GA/GS、Oxidase、O/129 Sensitivity
- 確認試驗：葡萄糖氧化/發酵、精胺酸二水解酶、離胺酸脫羧酶、鳥胺酸脫羧酶、嗜鹽性、 42°C 生長、歐普氏(VP test)、糖類發酵、硝基苯派喃半乳糖(ONPG)、Kanagawa現象

血清試驗

- 細菌本體抗原抗血清凝集試驗〔Agglutination test of antigen with somatic (O) antisera test〕
- 細菌莢膜抗原抗血清凝集試驗〔Agglutination test of antigen with capsular (K) antisera test〕

增菌培養→分離純化

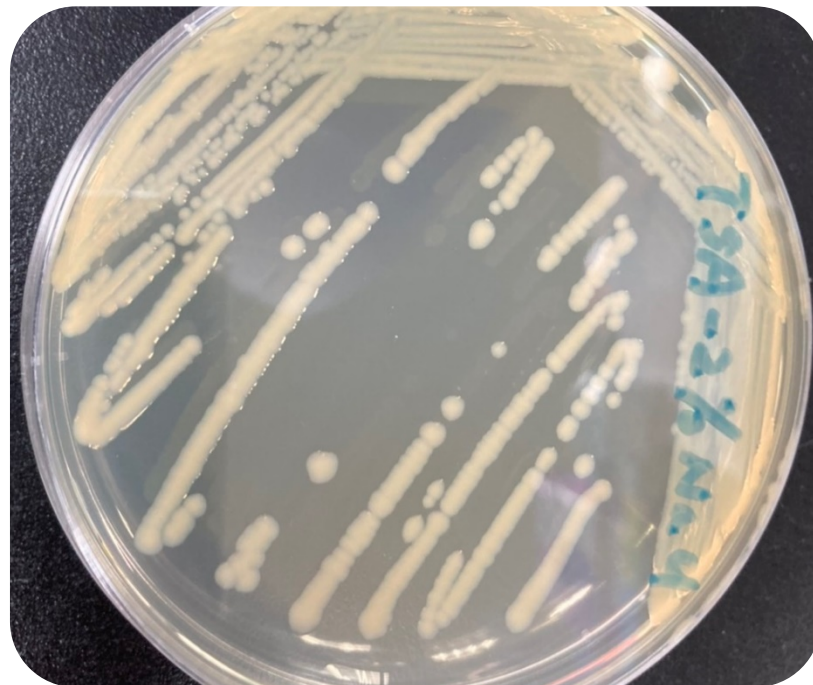


吸取各檢液1 mL
，接種於APW培
養液9 mL，各3支
(3階3支)

增菌培養：
A P W 培 養 液 於
35±2℃隔夜培養
(18~24 h)

分離純化培養：
鉤取菌液(液面起
深1 cm處)，劃線
接種於TCBS，於
35±2℃隔夜培養
(18~24 h)。

增菌培養→分離純化



觀察菌落型態：

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。

活化分離菌株：

鉤菌至少3個可疑菌落，同時接種於
TSA 及 TSB-2% 或 3% NaCl，於
35±2°C隔夜培養，供後續生化試驗。

生化試驗

□ 傳統生化試驗

初步試驗、確認試驗

□ API生化測試套組

□ Vitek自動微生物鑑定系統

※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。



初步試驗

1. 精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗
2. 三糖鐵培養基(TSI)試驗
3. 革蘭氏染色(Gram stain)
4. 運動性試驗(Motility test)
5. 動物膠培養基(GA)及動物膠鹽類培養基(GS)試驗
6. 細胞色素氧化酶試驗(Cytochrome oxidase test)
7. O/129敏感性試驗(O/129 sensitivity test)

精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗

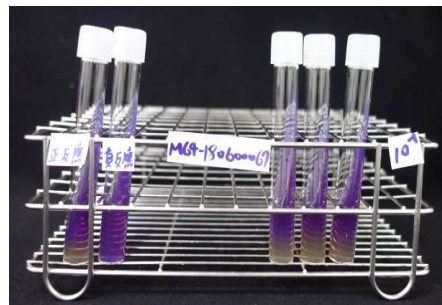
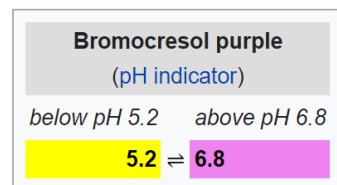
- 原理：葡萄糖發酵(產酸→溴甲酚紫變黃)及產氣，硫代硫酸鈉→還原為 H_2S + 檸檬酸鐵銨→黑色硫化鐵
- 流程：鉤菌→AGS培養基斜面劃線及穿刺接種→鬆蓋後於 $35 \pm 2^\circ C$ 隔夜培養(18~24 h)
- 結果：腸炎弧菌不產生硫化氫或氣體，典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和酸性(黃色)底部。

試驗或基質		正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應
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	-

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

蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
胰化蛋白胨(tryptone)	10 g
氯化鈉	20 g
葡萄糖(glucose)	1 g
L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3$)	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 $121^\circ C$ 滅菌10~12分鐘後作成斜面培養基，最終 pH 值為 6.9 ± 0.1 。



三糖鐵培養基(TSI)試驗

- ❑原理：細菌糖類(乳糖、蔗糖和葡萄糖)利用及硫化氫(變黑)的產生。葡萄糖被分解產酸可使斜面先變黃，但因量少且接觸空氣而氧化，及細菌利用培養基中含氮物質，生成鹼性產物，故使斜面變紅，底部為厭氧狀態，酸性物質不被氧化而仍保持黃色。
- ❑流程：鉤菌→TSI培養基斜面劃線及穿刺接種→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養(18~24 h)
- ❑結果：腸炎弧菌斜面應呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)，無裂痕及黑色產生。

試驗或基質		正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應
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	-

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<5秒
- (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**：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。

運動性試驗、動物膠利用試驗

運動性試驗(Motility test)

- 流程：鉤菌→MTM培養基穿刺接種(約2/3培養基深)→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養(18~24 h)
- 結果：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，腸炎弧菌為正反應。

運動性試驗培養基(Motility test medium, MTM)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	20 或 30 g
洋菜(agar)	4 g
蒸餾水	1000 mL

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

動物膠培養基(GA)試驗/ 動物膠鹽類培養基(GS)試驗

- 流程：鉤菌→接種於 GA(0% NaCl)及 GS 培養基(3% NaCl)→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 ~ 24h
- 結果：腸炎弧菌於 GA 培養基不能生長，可生長於 GS 培養基，菌落周圍會出現不透明環。

動物膠鹽類培養基(Gelatin salt agar, GS)

蛋白胨(peptone)	4 g
酵母抽出物(yeast extract)	1 g
動物膠(gelatin)	15 g
氯化鈉	30 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

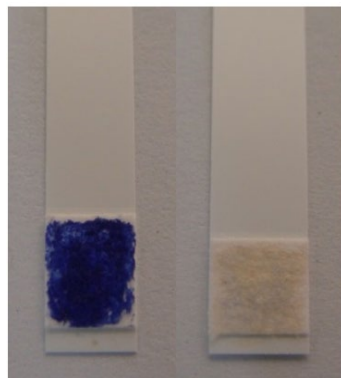
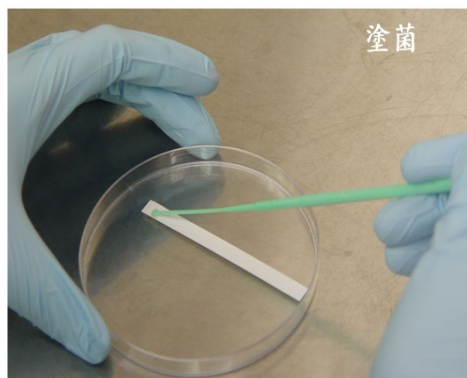
加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。



細胞色素氧化酶試驗、O/129敏感性試驗

細胞色素氧化酶試驗 (Cytochrome oxidase test)

- 流程：鉤菌並塗抹於氧化酶試紙(使用無菌鉑鉍接種環或玻璃棒，勿使用鎳鉻製品，以避免偽陽性)。
- 結果：正反應會慢慢有**深紫色**出現(10~15秒)，否則為負反應，腸炎弧菌為正反應。



正反應

負反應

O/129敏感性試驗 (O/129 sensitivity test)

- 流程：含O/129 10 µg及紙錠150 µg紙錠貼於已接種菌之TSA-2%或3% NaCl(或菌接種於已含有O/129 10 及 150 µg/mL 之 TSA-2% 或 3% NaCl)，35±2°C隔夜培養。
- 結果：腸炎弧菌應對含O/129 10 µg者具耐受性(生長)，對150 µg者具敏感性(不生長)。

確認試驗

1. 葡萄糖氧化/發酵試驗(Glucose oxidation-fermentation test)
2. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)
3. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)
4. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test)
5. 嗜鹽性試驗(Halophilism test)
6. 42°C生長試驗(Growth test, 42°C)
7. 歐普氏試驗(VP test)
8. 糖類發酵試驗(Fermentation test)
9. 硝基苯派喃半乳糖試驗(ONPG test)
10. Kanagawa現象(Kanagawa phenomenon)

確認試驗

葡萄糖氧化/發酵試驗(Glucose oxidation-fermentation test)

- 流程：鉤菌→接種於 2 支HLGB培養液， 1 支注入已滅菌液態石蠟油或礦物油 (高約1 ~ 2 cm)→35±2°C培養2天→觀察反應情形
- 結果：腸炎弧菌應對葡萄糖發酵及氧化，但不產氣，其顏色變化如下表。

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

反應	未加液態石蠟試管 (Aerobic)	添加液態石蠟試管 (Anaerobic)
氧化	黃色(+)	紫色(-)
發酵	黃色(+)	黃色(+)
HLGB培養	紫色(-)	紫色(-)

蛋白陳(peptone)	2 g
酵母抽出物(yeast extract)	0.5 g
氯化鈉	30 g
葡萄糖(glucose)	10 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.015 g
洋菜(agar)	3 g
蒸餾水	1000 mL

If the medium in the anaerobic tube turns **yellow**, then the bacteria are **fermenting glucose**. If the tube with oil doesn't turn yellow, but the open tube does turn yellow, then the bacterium is oxidizing glucose.

確認試驗

- 1.精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)
- 2.離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)
- 3.鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test)

■ 原理：胺基酸脫羧酶→胺基酸脫羧生成胺
(鹼性+溴甲酚紫→紫色)和二氧化碳

■ 流程：鉤菌→分別接種於脫羧酶基礎培養液及胺基酸(精胺酸、離胺酸或鳥胺酸)脫羧酶培養液，接種後注入已滅菌液態石蠟油或礦物油(高約1~2 cm)→鬆蓋後於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養4天，每24小時觀察一次

■ 結果：脫羧酶基礎培養基呈黃色者且胺基酸脫羧酶培養液呈紫色為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌的反應如下表。

試驗或基質	正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應
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	+

脫羧酶基礎培養液 (Decarboxylase basal medium)

蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
氯化鈉	20或30 g
葡萄糖(glucose)	1 g
溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.02 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，取L-精胺酸鹽酸鹽(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(L-lysine)，L-鳥胺酸(L-ornithine)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。



Escherichia coli ATCC™ 25922 Proteus vulgaris ATCC™ 13315
Lysine Decarboxylase Broth



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

確認試驗

嗜鹽性試驗 (Halophilism test)

- 流程：鈎菌 → T_1N_0 、 T_1N_6 、 T_1N_8 及 T_1N_{10} 培養液 → $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養
- 結果：腸炎弧菌可在 T_1N_6 及 T_1N_8 生長良好，但在 T_1N_0 無法生長， T_1N_{10} 生長極緩慢或不能生長。

T_1N_0	T_1N_6	T_1N_8	T_1N_{10}
No growth	Good growth	Good growth	No/Weak growth

胰化酪蛋白鹽化培養液(Tryptone salt broth, TN)

胰化酪蛋白或胰化蛋白胨(trypticase or tryptone) 10 g

蒸餾水 1000 mL

於此培養液內加入氯化鈉，配製成含0、6、8及10%不同濃度之胰化酪蛋白鹽化培養液(T_1N_0 , T_1N_6 , T_1N_8 , T_1N_{10})，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 。

42°C生長試驗 (Growth test, 42°C)

- 流程：鈎菌 → TSB-2% NaCl 培養液 → 42°C 水浴培養24h
- 結果：培養液呈混濁狀者為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌為正反應。

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

植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2.5 g
氯化鈉	20 或 30 g
葡萄糖(dextrose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

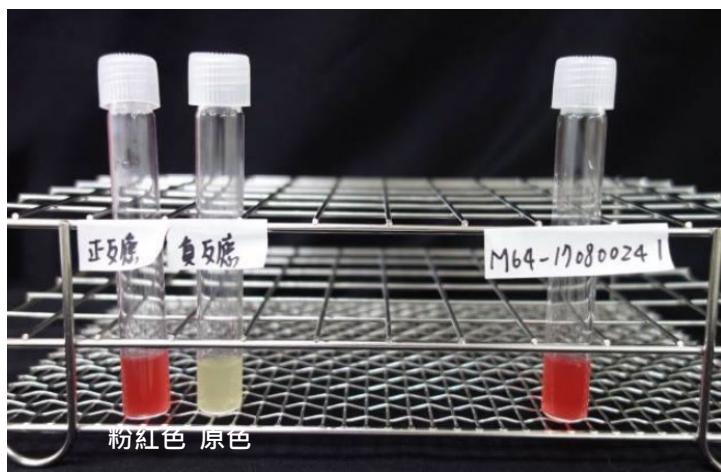
加熱溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以 121°C 滅菌15分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。



確認試驗

歐普氏試驗(VP test)

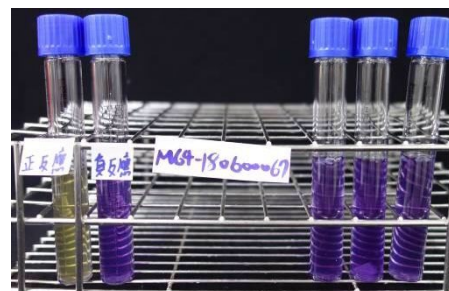
- 流程：鈎菌→MR-VP培養液→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養48h→培養液1 mL加入歐普氏試劑(溶液A：0.6 mL、溶液B：0.2 mL)→加入少許肌酸，輕輕搖勻→4h觀察結果
- 結果：呈現粉紅色者，為正反應，否則為負反應。腸炎弧菌為負反應。



發酵試驗(Fermentation test)

- 流程：鈎菌→糖類溴甲酚紫培養液→注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油(高約1~2 cm)→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養4~5天，每24小時觀察一次
- 結果：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、甘露糖及阿拉伯糖為正反應，對蔗糖及乳糖為負反應。

試驗或基質		正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應
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	+



確認試驗

硝基苯派喃半乳糖試驗(ONPG test)

- 原理：測定 β -galactosidase(半乳糖苷酶)→黃色呈色物質(鄰硝[苯]酚, o-nitrophenol)
- 流程：鉤菌→0.85%生理食鹽水0.2 mL→懸浮菌液→ONPG試劑小圓片濾紙→ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養6~24小時
- 結果：小圓片濾紙變成黃色者為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌為負反應。

硝基苯派喃半乳糖試劑(ONPG reagent)

硝基苯派喃半乳糖(*O*-nitrophenyl- β -D-galactoside) 80 mg溶於 37°C 蒸餾水15 mL，再加入1.0 M磷酸二氫鈉溶液5 mL，冷藏備用，使用時須加溫至 37°C 。

確認試驗

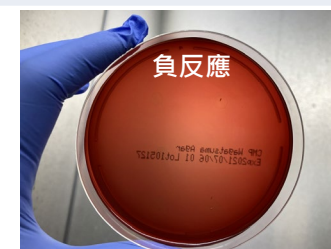
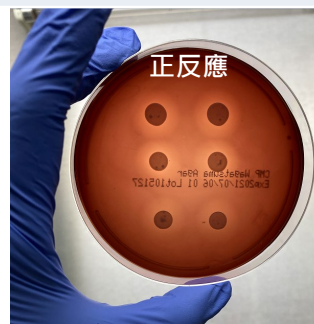
神奈川現象(Kanagawa phenomenon, KP)

- ❑ 從腸感染患者糞便中分離出的腸炎弧菌在特殊培養基(如Wagatsuma agar)具有溶血性，而從海鮮和海水中分離出的副溶血性弧菌通常不會，稱為 Kanagawa phenomenon (KP)。
- ❑ 檢測菌株是否具有致病性之指標
- ❑ 研究指出，病患檢體之分離臨床菌株 96.5%為KP陽性，而從海產食品等環境檢體分離者只有1~2%。
- ❑ 流程：增菌培養液(TSB-2或3% NaCl, 18h)→滴數滴至完全乾燥的Wagatsuma agar(雙重複試驗，另作+/-對照組)→培養(35±2°C, 24h)後觀察結果溶血現象(不得超過24小時)。
- ❑ 結果：正反應係由β-溶血作用造成，菌落周圍的紅血球變成透明乾淨，無同心環或綠變。透明環直徑為3 mm或大於3 mm以上為Kanagawa正反應，通常分離自食品之腸炎弧菌為負反應。

Wagatsuma培養基(Wagatsuma agar)

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	70 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5 g
甘露糖醇(mannitol)	10 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整pH值為8.0±0.2，蒸氣加熱30分鐘(不可高壓滅菌)，冷卻至45~50°C時，加入5%(v/v)經生理食鹽水洗滌3次之人或兔的紅血球，搖動混合使絮狀沉澱物分散均勻(避免產生氣泡)，倒入每一培養皿約15~20 mL，乾燥後立即使用。



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

結果判定

試驗或基質		正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應 ^a
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	-
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呈透明	+
葡萄糖氧化/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	T ₁ N ₀ , T ₁ N ₁₀	可生長	不生長或生長極緩慢	-
	T ₁ N ₆ , T ₁ N ₈	可生長	不生長或生長極緩慢	+
42°C生長試驗		混濁	澄清	+
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	+

結果判定

試驗或基質		正反應(+)	負反應(-)	腸炎弧菌反應 ^a
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	+ / - ^b
細菌本體抗原抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	+ / -
細菌莢膜抗原抗血清凝集試驗		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。

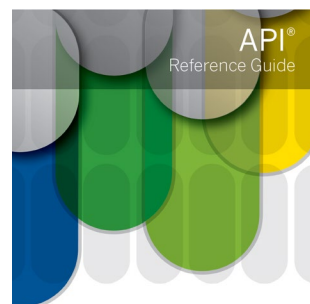
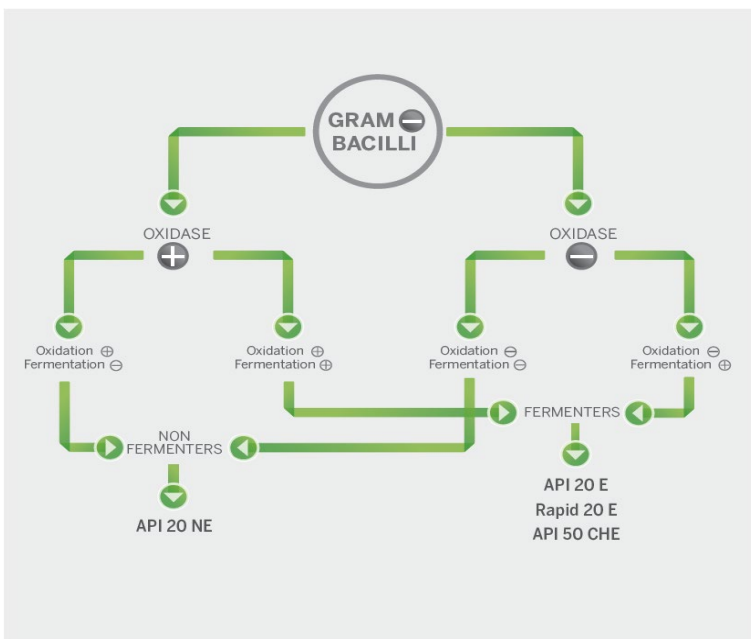
^b：分離自食品之腸炎弧菌通常為負反應；分離自糞便之腸炎弧菌，則通常為正反應。



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 C AUX	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>Vibrio cholerae</i>	●		●	●												●				●	●					
<i>Vibrio fluvialis</i>	●		●	●												●				●	●					
<i>Vibrio metschnikovii</i>				●												●				●	●					
<i>Vibrio mimicus</i>	●			●												●				●	●					
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	●			●												●				●	●					
<i>Vibrio vulnificus</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

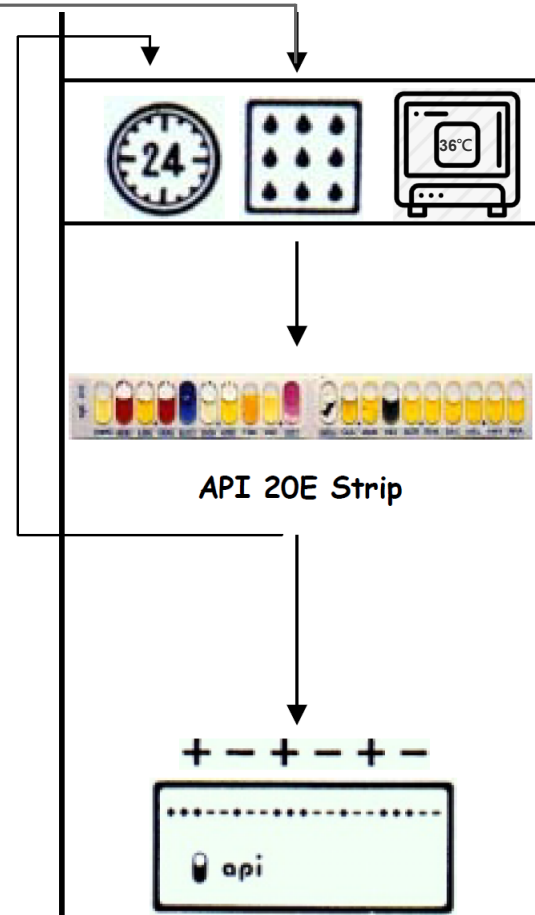


API 20E Strip

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



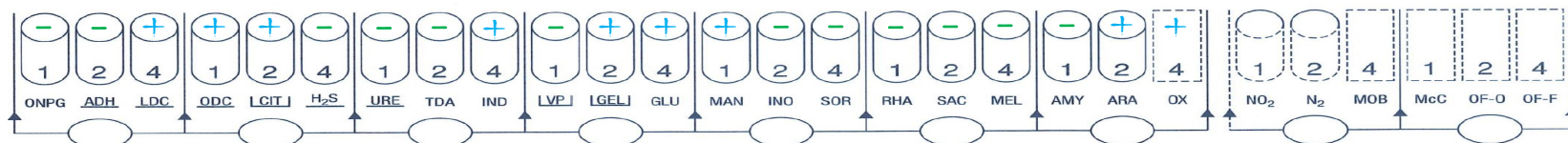
REF :

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

API® 20 E

測試結果



Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

YouTube 影音教學 :

<https://www.youtube.com/watch?v=PXlis18qN9k>

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

Brand 2010/2018

Imprimé en France / Printed in France

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

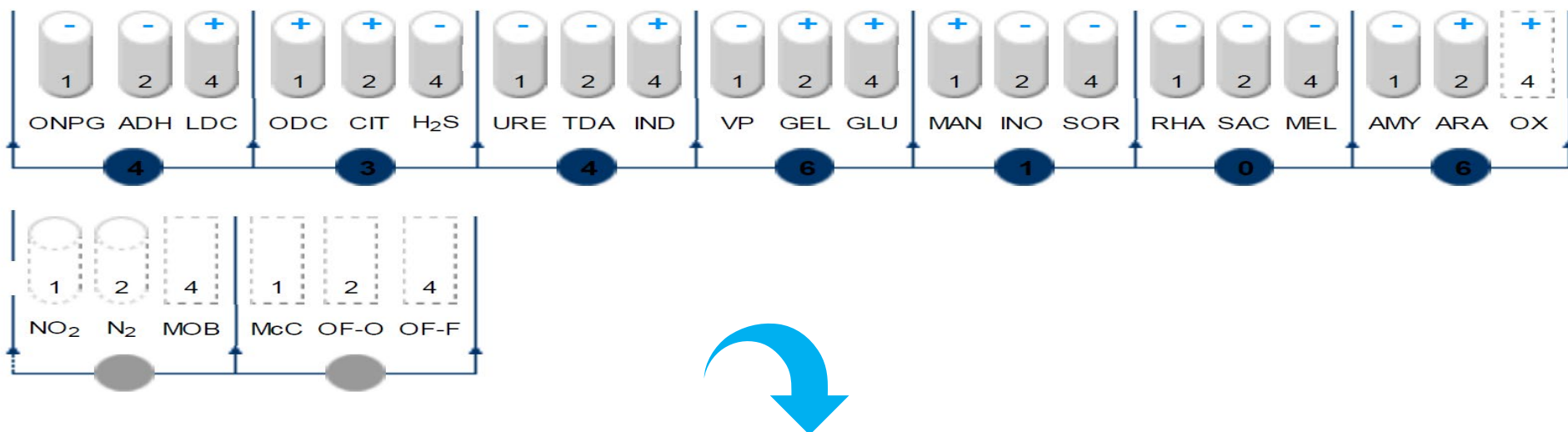
<https://apiweb.biomerieux.com/login>



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



EXCELLENT IDENTIFICATION

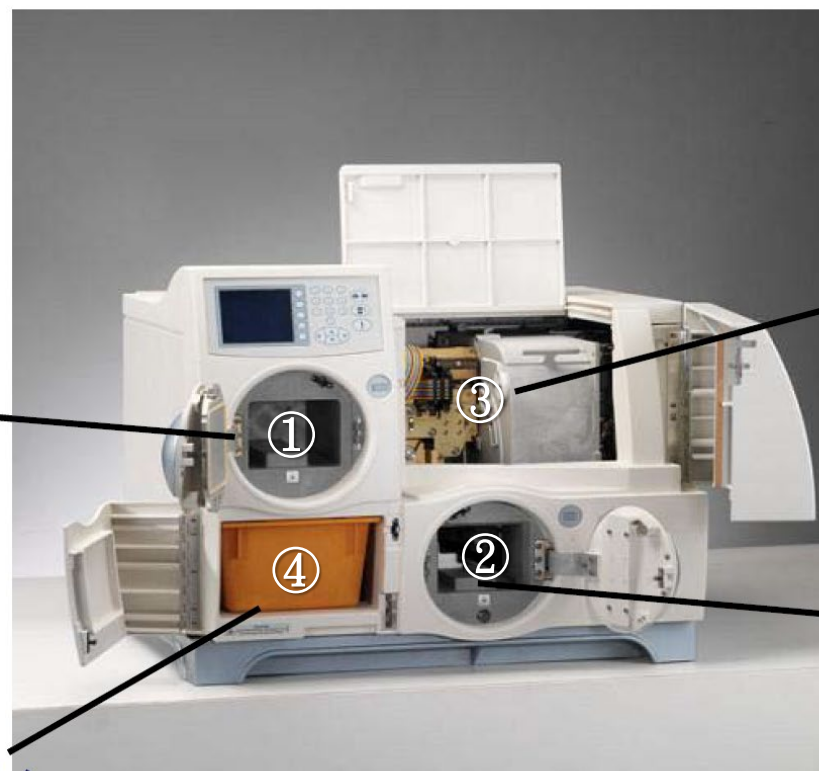
Strip	API 20 E V5.0
Profile	4 3 4 6 1 0 6
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Vibrio parahaemolyticus	99.9	1.0				

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Vibrio alginolyticus	0.1	0.39	SAC 99%	ARA 1%		



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)



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

分離純化菌株劃線培養於TSA-2%或3% NaCl
(35°C, 18~24小時)

製備菌液

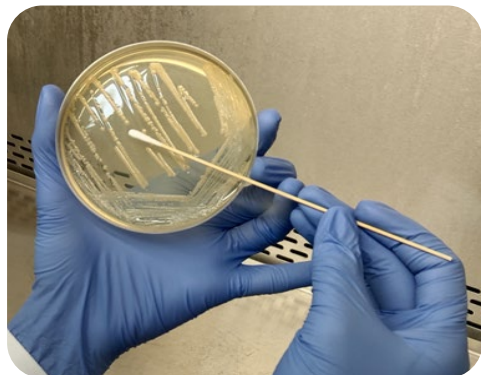
- 0.45%無菌食鹽水3 mL加入專用小管
- 無菌棉花棒沾取菌落，製備懸浮菌液
- 調整懸浮菌液濃度至0.50~0.63 McF(McFarland←比濁計測定)

Vitek上機

- 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(時間少於10小時)

Vitek自動微生物鑑定系統

棉花棒沾取菌落



調整菌液濃度



GN鑑定卡片



設定工作表



裝載卡片



充填卡片



Vitek鑑定報告

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Sep 13, 2018 14:47 CST
Printed by: LabSuper

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410508203	Expires: Apr 18, 2019 12:00 CST
	Completed: Sep 11, 2018 16:34 CST	Status: Final	Analysis Time: 6.50 hours
Selected Organism	97% Probability	Vibrio parahaemolyticus	
	Bionumber: 0025611150501223	Confidence: Excellent identification	
SRF Organism			
		% Probability	Confidence Level
Analysis Organisms and Tests to Separate:		96~99%	Excellent
Analysis Messages:		93~95%	Very Good
Contraindicating Typical Biopattern(s)		89~92%	Good
Vibrio parahaemolyticus SAC(21)		85~88%	Acceptable

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	+			



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

107年IFM能力試驗-霍亂弧菌、腸炎弧菌、大腸桿菌

PT Round Order Code	Enrolment Close Date	Sample Dispatch Date	Results Due Date	Samples per program, sample content, format and available tests	
18SF	23-Jul-2018	03-Sep-2018	01-Oct-2018	Seafood paste	2 x freeze dried real seafood (A/B); Reconstituted prior to testing Count (/g): <i>E. coli</i> Detection (/0.1g): <i>E. coli</i> ; Detection (/25g): <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>



Sample (A)	MALDI-TOF MS	Real-time PCR
<i>Vibrio cholera</i>	—	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—
<i>Vibrio albensis</i>	+	—

+, positive identification; —, negative identification

定序分析結果

	Cumulative Reads
<u>Vibrio cholerae</u>	11,525
<i>Vibrio</i> sp. 2521-89	212
<i>Vibrio mimicus</i>	163
<i>Vibrio anguillarum</i>	83
<i>Vibrio vulnificus</i>	76
<i>Vibrio fluvialis</i>	68

Reads per Barcode ID		
ID	Read Count	
BC02	242	INCLUDE
BC03	12,753	EXCLUDE
BC04	5	INCLUDE
BC05	1	INCLUDE
No Barcode	3,058	INCLUDE

結果報告

Test Name	Result	Log10	Median	NIQR	Exclude	ZScore	Evaluation
Sample: (A) Seafood paste							
Detection of <i>E. coli</i> (per 0.1g) by method: Spread	P						✓
Detection of <i>Vibrio cholerae</i> (per 25g) by method: MPN	P						✓
Detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (per 25g) by method: MPN	A						✓
<i>E. coli</i> Count (cfu/g) by method: Spread	1300	3.1139	2.9058	0.2807		0.7416	☐

P: positive identification A: negative identification

Sample	Vp	Vc
A	—	+
B	+	—



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

最確數 (Most probable number, MPN)計算

判定為腸炎弧菌之各階試管數，利用接種量為每試管**0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)**之3階3支最確數表(如下表)，推算出腸炎弧菌之最確數(MPN/g或MPN/mL)。

正反應試管數			MPN/g (mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			MPN/g (mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1*	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	--	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	--

最確數(Most probable number, MPN)計算

最確數表適用的接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

$$\text{最確數MPN/g (MPN/mL)} = \frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量} \times 10}$$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為3-1-0時，對照最確數表之最確數為43，

(1)當接種量為各階試管含檢體1, 0.1, 0.01 (g或mL)，推算出測試菌之最確數=

$$\frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(2)當接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，推算出測試菌之最確數=

$$\frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(3)當接種量為各階試管含檢體0.01, 0.001, 0.0001 (g或mL)，推算出測試菌之最確數=

$$\frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

腸炎弧菌抗血清試驗

Vibrio parahaemolyticus Antisera "Seiken"

O grouping sera

Set of 11 vials

O sero (O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10 and O11)

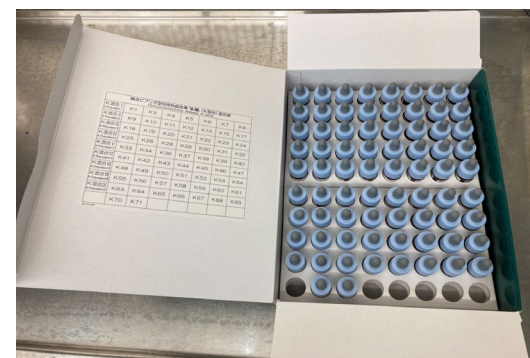
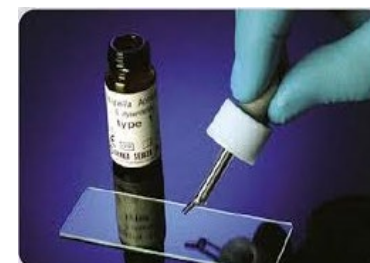
K typing sera

Set of 74 vials

1. Polyvalent 9 vials (I 、 II 、 III 、 IV 、 V 、 VI 、 VII 、 VIII and IX)

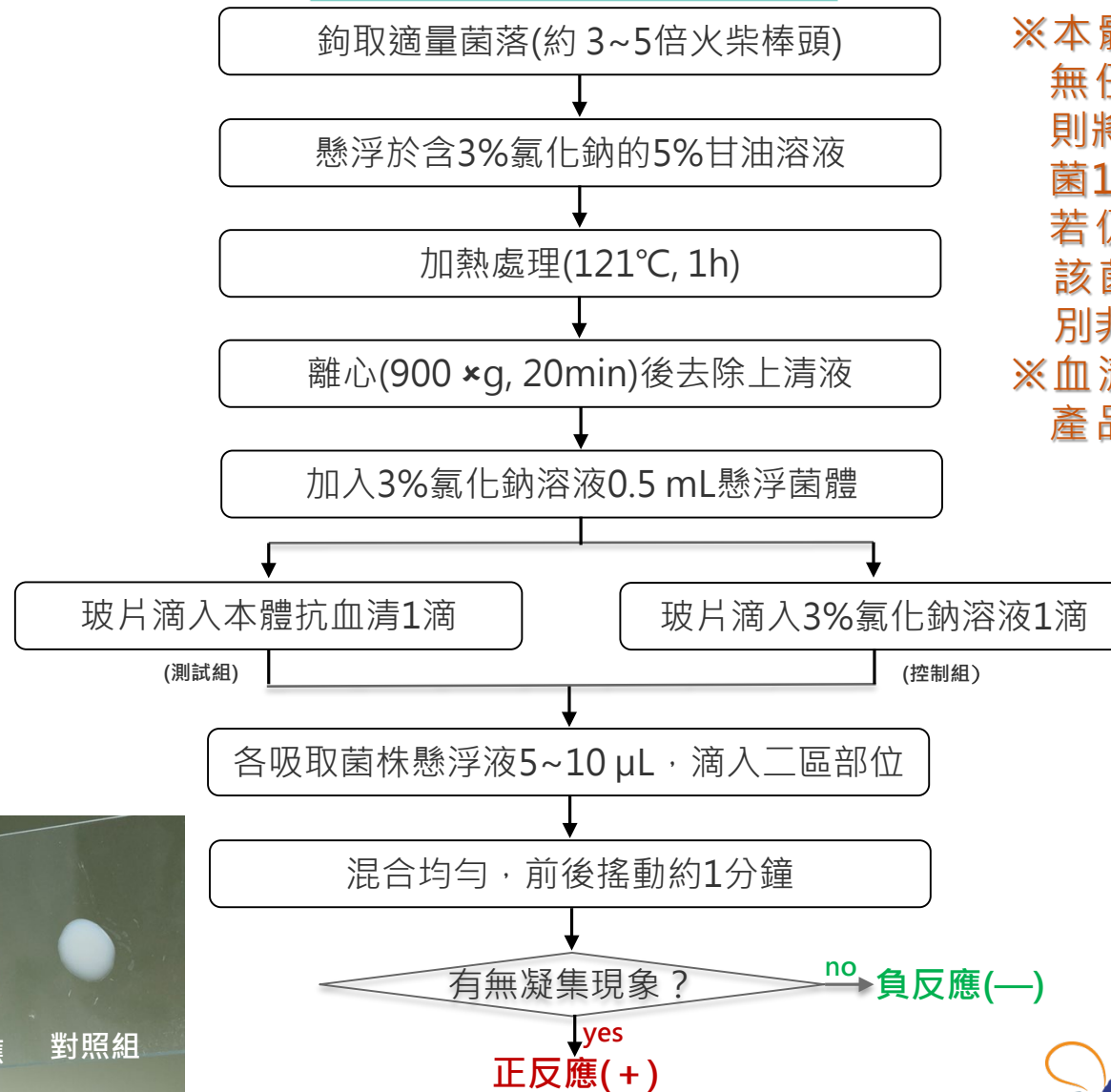
2. Mono 65 vials (K I -KIX except K2, K14, K16, K27, K35 and K62)

Polyvalent 9 vials	K agglutinins present						
I	1	3	4	5	6	7	8
II	9	10	11	12	13	15	17
III	18	19	20	21	22	23	24
IV	25	26	28	29	30	31	32
V	33	34	36	37	38	39	40
VI	41	42	43	44	45	46	47
VII	48	49	50	51	52	53	54
VIII	55	56	57	58	59	60	61
IX	63	64	65	66	67	68	69
	70	71					



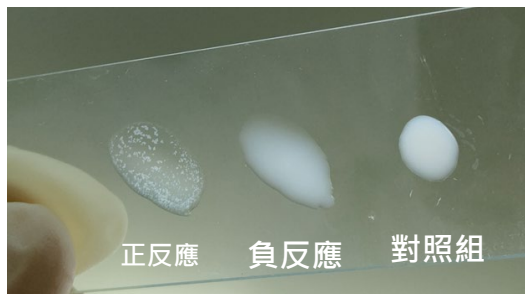
細菌本體抗原抗血清凝集試驗

Agglutination test of antigen with somatic (O) antisera test



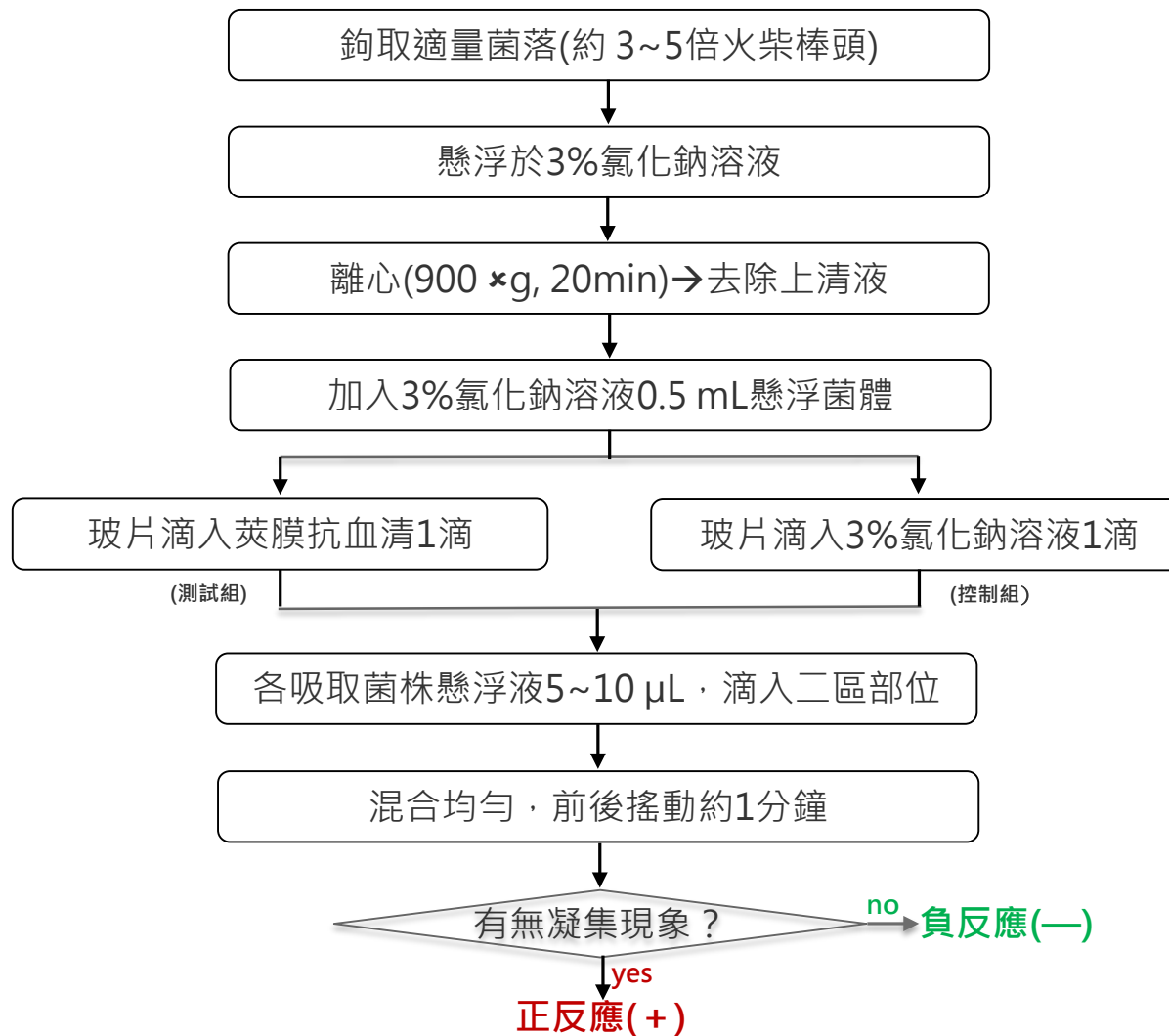
※本體抗原抗血清均無任何凝集現象，則將菌液以121°C滅菌1小時後再測試，若仍呈負反應，則該菌之本體抗原型別非為所測試者

※血清型別試驗請依產品說明進行檢測



細菌莢膜抗原抗血清凝集試驗

Agglutination test of antigen with capsular (K) antisera test



※多價莢膜抗血清試驗 → 單價莢膜抗血清試驗

食品中腸炎弧菌檢驗方法Q&A

問題

回答

1

執行氧化酶試驗時，是否可使用鎳鉻合金(nichrome)接種環將菌落塗抹於氧化酶試劑濾紙？

使用鎳鉻合金(nichrome)接種環，因其材質中可能**含有鐵成分**，進行氧化酶試驗時可能產生**偽陽性**反應，故請使用**鉑鈱材質**(platinum/iridium)或**可拋棄式**者(如已滅菌之塑膠接種環、牙籤)執行此項試驗。

2

TCBS培養基生長之可疑菌落如經生化試驗鑑別為腸炎弧菌陽性者，是否仍應進行抗血清試驗？

疑似腸炎弧菌之分離菌株經**生化試驗**鑑別為陽性者，無需進行抗血清試驗**即可判定**為腸炎弧菌。若需進一步判定型別，則再進行抗血清試驗，以確認其本體抗原(O)及莢膜抗原(K)之抗血清型別。

食品中腸炎弧菌檢驗方法Q&A

問題

回答

3

2.4.1.1.節提及為提高加熱、乾燥、冷凍等檢體之檢出率，取10倍稀釋檢液10 mL，加入2X APW 10mL，使APW內含檢體量1 g係指何意？及如何計算最確數(MPN/g)？

1.10倍稀釋檢液**1mL=0.1 g**檢體量，故其檢液10 mL相當於APW內含檢體量1 g (=10 mL x 0.1 g/mL)。

2.MPN依其說明例(1)進行計算，對照MPN表之值÷10。例如：正反應試管數3-1-0→MPN/g=43/10=4.3

4

病原菌公告檢驗方法，有關第二部份之real-time PCR方法是否為必要進行之檢驗呢？

第一部之病原菌分離、計數及鑑別為必要執行之檢驗；第二部份之real-time PCR檢驗可視需要執行，主要乃輔助菌種快速鑑別。

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/>