

寵物食品中微生物之檢驗方法—致病性大腸桿菌之檢驗

Methods of Test for Pet Foods Microorganisms Test of Pathogenic *Escherichia coli*

1. 適用範圍：本方法適用於寵物食品中致病性大腸桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，進行定性分析。
 - 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 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 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、結晶紫(crystal violet)、甲基紅(methyl red)、伊紅 Y (eosin Y)、亞甲藍(methylene blue)、磷酸氫銨鈉($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鈉($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、檸檬酸鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、核糖醇(adonitol)、纖維雙糖(cellobiose)、阿拉伯糖(arabinose)、甘露糖醇(mannitol)、山梨糖醇(sorbitol)、膽鹽(bile salts No.3)、中性紅(neutral red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、亞甲藍(methylene blue)、溴瑞香草藍(bromothymol blue)、酚紅(phenol red)、離胺酸(L-lysine)、黏液酸(mucic acid)、無水硫酸鎂(MgSO_4)、尿素(urea)、草酸銨、碘化鉀、氰化鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、對-二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethylaminobenzaldehyde)、 α -萘酚(α -naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、95%乙醇、無水乙醇、戊醇(amyl alcohol)、異戊醇(isoamyl alcohol)、鹽酸、硝酸鉀(KNO_3)、醋酸鈉(CH_3COONa)、液態石蠟、氫氧化鈉、鄰硝基苯吡喃半乳糖(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)、*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylene-diamine dihydrochloride)、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、冰醋酸、萘基乙二胺鹽酸鹽〔*N*-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride〕、硫酸銨亞鐵〔 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 〕、硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80, Tween 80)、硫酸銨〔 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 〕、丙二酸鈉(sodium malonate)及鋅粉均採用化學試藥級；洋菜(agar)、胰化酪蛋白(trypticase)、心肌浸出物(heart muscle infusion)、硫蛋白胨(thiotone)、聚蛋白胨(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、胨蛋白胨(proteose peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)及蛋白胨(peptone)均採用微生物級。

2.3 器具及材料

- 2.3.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
- 2.3.2 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.3 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
- 2.3.4 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.5 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。
- 2.3.6 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.7 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.8 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
- 2.3.9 燈箱：觀察血清試驗用。
- 2.3.10 天平：可稱量到 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 100 g 者，靈敏度為 1 mg。
- 2.3.11 旋渦混合器。
- 2.3.12 酸鹼度測定儀。
- 2.3.13 加熱器。
- 2.3.14 攪拌器。
- 2.3.15 吸管輔助器或微量吸管。
- 2.3.16 吸管：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
- 2.3.17 吸管尖：10 μL 、20 μL 、200 μL 及 1000 μL 。
- 2.3.18 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。
- 2.3.19 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐 121°C 濕熱滅菌 20 分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。
- 2.3.20 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 9×22 mm 或其他適用者。
- 2.3.21 試管： 13×100 mm、 16×150 mm 或其他適用者。
- 2.3.22 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈹或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.3.23 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.3.24 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.3.25 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。

2.3.26 研鉢、杵：研磨試藥用。

2.3.27 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性濾膜。

2.3.28 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。

2.4 試劑

2.4.1 30%氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 30 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

2.4.2 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液：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 至 pH 值為 7.0，再加蒸餾水使成 50 mL，冷藏備用。

2.4.3 鄰硝苯基吡喃半乳糖試劑(ONPG reagent)：取鄰硝苯基吡喃半乳糖 80 mL，溶於 37°C 蒸餾水 15 mL，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。

2.4.4 5 N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 20 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

2.4.5 5 N 醋酸溶液：取冰醋酸 286 ml，加蒸餾水 715 ml。

2.4.6 50%葡萄糖溶液：稱取葡萄糖 5 g，溶於蒸餾水 10 mL，以無菌濾膜過濾。

2.4.7 0.5%氰化鉀溶液：取氰化鉀 0.5 g，溶於冷卻至 5~8°C 之蒸餾水 100 mL。(氰化鉀劇毒，調製時均應冷卻至 5~8°C，保存期限以不超過 2 週為宜。)

2.4.8 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)：取對-二甲胺基苯甲醛 5 g，溶於戊醇或異戊醇 75 mL，再徐徐加入鹽酸，混合均勻後應呈黃色，冷藏備用。

2.4.9 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagent, VP reagents)：

溶液 A：取 α -萘酚 5 g，溶於無水乙醇 100 mL。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g，溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.4.10 氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)：取 N,N,N',N' -四甲基對苯二胺鹽酸鹽 1 g，溶於蒸餾水 100 mL，保存於褐色瓶，冷藏備用，使用期限以不超過一星期為宜。

2.4.11 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite test reagents)：

試劑 A：取對-胺基苯磺酸 1 g，溶於 5 N 醋酸溶液 125 mL。

試劑 B：取萘基乙二胺鹽酸鹽 0.25 g，溶於 5 N 醋酸溶液 200 mL。

2.4.12 0.85%生理食鹽水：取氯化鈉 8.5 g 溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於容器，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.4.13 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)：取甲基紅 0.1 g，溶於 95%乙醇 300 mL，再加蒸餾水使成 500 mL。

2.4.14 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)：取蛋白胨 10 g、氯化鈉 5 g、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 3.5 g 及磷酸二氫鉀 1.5 g，溶於蒸餾水使成 1000 mL，分裝於容器，以 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

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

2.5.1 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。

2.5.2 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g，於研鉢研磨 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，將此溶液注入褐色瓶，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。

2.5.3 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 1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，要注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.6 血清

2.6.1 致病性大腸桿菌多價本體抗血清(Polyvalent "O" type antisera)。

2.6.2 致病性大腸桿菌單價本體抗血清(Monovalent "O" type antisera)。

2.7 培養基

2.7.1 磷酸胰化蛋白胨培養液(Tryptone Phosphate broth, TP)

	單倍濃度	雙倍濃度
胰化蛋白胨(tryptone)	20 g	40 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2 g	4 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	2 g	4 g
氯化鈉(NaCl)	5 g	10 g
聚山梨醇酯 80(Polysorbate 80)	15 mL	30 mL

蒸餾水	1000 mL	1000 mL
-----	---------	---------

加熱溶解後，分裝於容器，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。

2.7.2 腦心浸出培養液(Brain heart infusion broth, BHI)

牛腦浸出物(calf brain infusion)	200 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.7.3 伊紅亞甲藍培養基(Levine's eosin methylene blue agar, L-EMB)

蛋白胨(peptone)	10 g
乳糖(lactose)	10 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2 g
洋菜(agar)	15 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，分裝於容器，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.1±0.2。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，培養皿約倒入 15~20 mL，凝固後打開皿蓋約 1/2~1/4，使培養基之表面乾燥。已注入培養皿之培養基宜當天使用，冷藏備用者應於使用前檢查有無雜菌之污染。

2.7.4 馬康奇培養基(MacConkey agar)

胨蛋白胨(proteose peptone)	3 g
蛋白胨(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
膽鹽(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g

結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於容器，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.1±0.2。

2.7.5 血液基礎培養基(blood agar base, BAB)

心肌浸出物(heart muscle infusion)	375 g
硫蛋白朊(thiotone)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於容器，以 121°C 滅菌 20 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2。

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

聚蛋白朊(polypeptone)	20 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硫酸銨亞鐵 [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.2 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.2 g
酚紅(phenol red)	0.025 g
洋菜(agar)	13 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分取 5 mL 注入試管，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約 4~5 cm，斜面底部之深度約 2~3 cm。

2.7.7 尿素培養液(Urea broth)

尿素(urea)	20 g
酵母抽出物(yeast extract)	0.1 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	9.1 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	9.5 g

酚紅(phenol red) 0.01 g

蒸餾水 1000 mL

溶解後，經無菌濾膜過濾，分取濾液 1.5~3 mL，注入已滅菌之試管，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.7.8 溴甲酚紫培養液(Bromocresol purple broth)

蛋白胨(peptone) 10 g

牛肉抽出物(beef extract) 3 g

氯化鈉(NaCl) 5 g

溴甲酚紫(bromocresol purple) 0.04 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取約 2.5 mL 注入裝有發酵管(觀察氣體產生者，如葡萄糖、甘露糖醇、乳糖)之試管，以 121°C 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% 葡萄糖溶液 278 μL ，使培養液中葡萄糖之最終濃度為 5% (w/v)。含核糖醇溶液、纖維雙糖溶液、阿拉伯糖溶液、甘露糖醇溶液、乳糖溶液及山梨糖醇溶液之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.7.9 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)

胰化蛋白胨(tryptone) 10 g

蒸餾水 1000 mL

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

2.7.10 離胺酸脫羧酶培養液(Lysine decarboxylase broth)

蛋白胨(peptone) 5 g

酵母抽出物(yeast extract) 3 g

葡萄糖(glucose) 1 g

離胺酸(L-lysine) 5 g

溴甲酚紫(bromocresol purple) 0.02 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入附有螺旋蓋之試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.7.11 氰化鉀培養液(Potassium cyanide broth)

基礎培養液

聚蛋白腯(polypeptone)	3 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	0.225 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	5.64 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，取 1000 mL 裝於容器，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.6±0.2。以安全吸球吸取 0.5% 氯化鉀溶液 15 ml，加入基礎培養液 1000 mL，混合均勻，分取 1~1.5 ml 注入已滅菌之試管。

2.7.12 MR-VP 培養液(MR-VP broth)

蛋白腯緩衝液粉末(buffered peptone-water powder)	7 g
葡萄糖(glucose)	5 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.7.13 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's citrate broth)

磷酸氫銨鈉(NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O)	1.5 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	1 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 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取 10 mL 注入附有螺旋蓋之試管，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7±0.2。

2.7.14 醋酸鹽培養基(Acetate agar)

醋酸鈉(CH ₃ COONa)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
無水硫酸鎂(MgSO ₄)	0.2 g
磷酸二氫銨(NH ₄ H ₂ PO ₄)	1 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	1 g
溴瑞香草藍(bromothymol blue)	0.08 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，始加入無水硫酸鎂並混搖均勻。分取 8 mL 注入試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約 5 cm。

2.7.15 黏液酸鹽培養液(Mucate broth)

蛋白胨(peptone)	10 g
黏液酸(mucic acid)	10 g
溴瑞香草藍(bromothymol blue)	0.024 g
蒸餾水	1000 mL

蛋白胨加熱溶解後，始加入黏液酸，再徐徐注入 5 N 氫氧化鈉溶液，攪拌使完全溶解，分取 5 mL 注入附有螺旋蓋之試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.1 。

2.7.16 黏液酸鹽對照培養液(Mucate control broth)

蛋白胨(peptone)	10 g
溴瑞香草藍(bromothymol blue)	0.024 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入附有螺旋蓋之試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.1 。

2.7.17 吲哚亞硝酸鹽培養基(Indole nitrite medium)

胰化酪蛋白(trypticase)	20 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	2 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硝酸鉀(KNO_3)	1 g
洋菜(agar)	1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分取 11 mL 注入試管，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

2.7.18 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract)	1 g
硫酸銨〔 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 〕	2 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	0.6 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	0.4 g
氯化鈉(NaCl)	2 g

丙二酸鈉(sodium malonate)	3 g
葡萄糖(glucose)	0.25 g
溴瑞香草藍(bromthymol blue)	0.025 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 3 mL 注入試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7±0.2。

2.8 檢液之調製^(註 2)

以無菌操作稱取檢體 25 g，置於無菌鐵胃袋或已滅菌均質杯內。加 BHI 培養液 225 mL，均質 2 分鐘。將已均質化之檢體混合液供作檢液。

註 2：處理含油脂量多、不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如 Tween 80，使其於檢液中濃度為 1 %)，並充分振搖，使之乳化。

2.9 增菌培養

將 2.8 節之檢液於室溫振盪培養 10 分鐘，再靜置 10 分鐘使檢體自然沉澱，取上層 BHI 培養液於另外已滅菌之容器，於 35°C 培養 3 小時，使細胞復甦(resuscitation)。移入等量之雙倍濃度之 TP 培養液，於 44±0.2°C 培養 20 小時。

2.10 分離培養

增菌培養之 2.9 節 TP 培養液鉤取一種環菌量，分別在 L-EMB 及馬康奇培養基表面劃線後，於 35°C 培養 20 小時，觀察所形成菌落之生長狀態，若為可疑致病性大腸桿菌者，菌落中央呈暗紫色，扁平，帶有或不帶金屬光澤，在馬康奇培養基上之菌落為紅色、無色、或淡粉紅色，挑取至少 5 個可疑菌落接種於血液基礎培養基，於 35°C 培養 24±2 小時，供作革蘭氏染色、生化試驗及血清型別試驗用。

2.11 鑑定試驗

2.11.1 革蘭氏染色(Gram stain)：

- (1) 加適量 0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)鉤取適量菌株，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，再水洗，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，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。結果為革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌者，則為可疑致病性大腸桿菌。

2.11.2 生化試驗：自 2.10 節之血液基礎培養基鉤菌，作以下試驗。

2.11.2.1 初步試驗

2.11.2.1.1 硫化氫產生試驗(H_2S production test)：鉤菌利用斜面劃線及穿刺法接種方法，TSI 斜面培養基，於 $35^{\circ}C$ 培養 20 ± 2 小時，培養基呈黑色者為正反應，否則為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。

2.11.2.1.2 尿素酶試驗(Urease test)：鉤菌接種於尿素培養液，於 $35^{\circ}C$ 培養 20 ± 2 小時，培養液由橘紅色變為紫紅色者為正反應，仍維持橘紅色者為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。

2.11.2.1.3 阿拉伯糖發酵試驗(Arabinose fermentation test)：鉤菌接種於阿拉伯糖溴甲酚紫培養液，於 $35^{\circ}C$ 培養 20 ± 2 小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，致病性大腸桿菌為正反應。

2.11.2.1.4 吲哚試驗(Indole test)：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液，於 $35^{\circ}C$ 培養 24 ± 2 小時，加入柯瓦克氏試劑 0.2 mL，輕輕搖動後靜置 10 分鐘，上層呈現紅色，則為正反應；否則為負反應，致病性大腸桿菌通常為正反應，經上述試驗確認為可疑致病性大腸桿菌時，始繼續進行以下試驗。

2.11.2.1.5 鄰硝苯基吡喃半乳糖試驗(ONPG test)：自 2.11.2.1.1 節之可疑致病性大腸桿菌反應之 TSI 培養基斜面上鉤菌，置於含有 0.85%生理食鹽水 0.2 mL 之試管，作成懸浮液後，再加入一片浸過鄰硝苯基吡喃半乳糖試劑之濾紙小圓片，輕輕搖動後，於 $35^{\circ}C$ 培養 6 小時，濾紙小圓片變成黃色者為正反應，否則為負反應，致病性大腸桿菌為正反應。

經鄰硝苯基吡喃半乳糖試驗確認為可疑致病性大腸桿菌時，始繼續進行以下試驗。

2.11.2.2 第二步試驗^(註 3)

- 2.11.2.2.1 核糖醇發酵試驗(Adonitol fermentation test)：鉤菌接種於核糖醇溴甲酚紫培養液，於 35°C 培養 48 小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.2 氰化鉀試驗(KCN test)：鉤菌接種於氯化鉀培養液後以橡皮塞封緊試驗管口，於 35°C 培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次，培養液由清澈狀變為混濁狀者為正反應，仍維持清澈狀者為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.3 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)：鉤菌接種於離胺酸脫羧酶培養液，徐徐注入液態石蠟至高約 2.5 cm，於 35°C 培養 96 ± 2 小時，每隔 24 小時觀察一次。培養液維持原紫色者為正反應，由紫色變為黃色者為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.4 歐普氏試驗(VP test)：鉤菌接種於 MR-VP 培養液，於 35°C 培養 48±2 小時，取培養液 1 mL 至另一已滅菌之試管，加入歐普氏試劑之溶液 A 0.6 mL 及溶液 B 0.2 mL 後，再加入少許肌酸，振搖均勻，經 2~4 小時後觀察結果，呈現粉紅色則為正反應，否則為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.5 纖維雙糖發酵試驗(Cellobiose fermentation test)：鉤菌接種於纖維雙糖溴甲酚紫培養液，於 35°C 培養 48±2 小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.6 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鉤菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液，於 35°C 培養 72~96 小時，呈現混濁狀，則為正反應；仍維持原澄清狀則為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.7 乳糖發酵試驗(Lactose fermentation test)：鉤菌接種於乳糖溴甲酚紫培養液，於 35°C 培養 48±2 小時，產生氣體者，則為正反應；未產生氣體者，則為負反應，致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.8 丙二酸鹽試驗(Malonate test)：鉤菌接種於丙二酸鹽培養液，於 35°C 培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次。培養液由綠色變為藍色者為正反應；仍維持綠色者為負反應，大部分致病性大腸桿菌為負反應。

- 2.11.2.2.9 甘露糖醇發酵試驗(Mannitol fermentation test)：鉤菌接種於甘露糖醇溴甲酚紫培養液，於 35℃ 培養 48±2 小時，顏色由紫色變為黃色，且有氣體產生者為正反應；否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.10 葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)：鉤菌接種於葡萄糖溴甲酚紫培養液，於 35℃ 培養 48±2 小時，顏色由紫色變為黃色，且有氣體產生者為正反應；否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.11 甲基紅試驗(MR test)：將 2.11.2.2.4 節剩餘之 MR-VP 培養液再培養 48±2 小時，加入甲基紅指示劑 0.3 ml，輕輕搖勻，仍為紅色，則為正反應；否則為負反應，致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.12 醋酸鹽氧化試驗(Acetate oxidation test)：鉤菌接種於醋酸鹽培養基斜面上，於 35℃ 培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次；斜面上有菌體生長且培養基由綠色變為藍色者為正反應；否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.13 黏液酸鹽利用試驗(Mucate utilization test)：鉤菌分別接種於黏液酸鹽培養液及黏液酸鹽對照培養液，於 35℃ 培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次。黏液酸鹽培養液由藍色變為黃色，而黏液酸鹽對照培養液仍維持藍色者為正反應；否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.14 氧化酶試驗(Oxidase test)：鉤菌接種(避免使用鎳鉻製品)於血液基礎培養基，於 35℃ 培養 24±2 小時，鉤取菌落後塗抹於滴有氧化酶試劑濾紙上，10~15 秒後變為深藍紫色者為正反應；否則為負反應，致病性大腸桿菌為負反應。
- 2.11.2.2.15 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)：鉤菌接種於吡啶亞硝酸鹽培養基，於 35℃ 培養 18~24 小時，取培養液 3 mL 至另一已滅菌之試管，加入亞硝酸鹽試驗試劑 A 及試劑 B 各 2 滴，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色則為正反應，若顏色無變化時加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。致病性大腸桿菌為正反應。
- 2.11.2.2.16 山梨糖醇發酵試驗(Sorbitol fermentation test)：鉤菌接種於山梨糖醇溴甲酚紫培養液，於 35℃ 培養 48±2 小時，培養液由紫色變為

黃色者為正反應；否則為負反應，大部分致病性大腸桿菌為正反應。

註 3：對於部分致病性大腸桿菌類似 *Shigella* 不產氣、無運動性、乳糖發酵較慢者，在離胺酸脫羧酶試驗、醋酸鹽氧化試驗、粘液酸鹽利用試驗中，其中一次或一次以上為正反應。

2.11.3 血清型別試驗：經革蘭氏染色及生化試驗確認為可疑致病性大腸桿菌陽性時，自 2.11.2 節鈎菌接種於血液基礎培養基，於 35°C 培養 24 小時，鈎取約 3~5 倍火柴棒頭之菌量，懸浮於 0.85% 生理食鹽水 3 mL，於 100°C 加熱 1 小時或 121°C 加熱 15 分鐘，以 900 ×g 離心 20 分鐘，去除上清液，再以 0.85% 生理食鹽水 0.5 mL 懸浮菌體，取菌液備用。利用蠟筆在載玻片上畫成兩部分，大小約 1 × 2 cm，於一部分滴入多價本體抗血清 1 滴，混合均勻，再於另一部分加入 0.85% 生理食鹽水 30 μL，作為對照組。各吸取懸浮菌液 5~10 μL，分別滴入載玻片上之兩部分內，混合均勻，反覆前後傾斜搖動 1 分鐘後觀察結果。正反應者有凝集現象，負反應者及對照組則為無凝集現象，致病性大腸桿菌為正反應。致病性大腸桿菌多價本體抗血清試驗呈正反應時，續以單價本體抗血清重複上述步驟進行確認。

註 4：血清型別試驗可參考使用經確效認可之市售套組，並依其產品說明進行檢測。

2.12 判定：致病性大腸桿菌陽性者，應符合下表所列之結果。

備註：如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

參考文獻

1. 食品微生物之檢驗方法-病原性大腸桿菌之檢驗。110 年 1 月 20 日衛授食字第 1091902961 號公告修正。
2. Feng, P., Weagant, S. D. and Jinneman, K. 2018. Chapter 4A Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual.
[<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>]

表、致病性大腸桿菌之生化反應

試驗	正反應 (+)	負反應 (-)	病原性大腸桿菌之反應
革蘭氏染色	陽性 (深紫色)	陰性 (粉紅色)	—
硫化氫產生試驗	黑色	非黑色	—
尿素酶試驗	紫紅色	橘紅色	—
阿拉伯糖發酵試驗	黃色	紫色	+
吲哚試驗	紅色	原色	+
鄰硝苯基吡喃半乳糖試驗	黃色	原色	+
核糖醇發酵試驗	黃色	紫色	—
氰化鉀試驗	混濁 (生長)	清澈 (未生長)	—
離胺酸脫羧酶試驗	紫色	黃色	+
歐普氏試驗	粉紅色	原色	—
纖維雙糖發酵試驗	黃色	紫色	—
檸檬酸鹽利用試驗	混濁 (生長)	清澈 (未生長)	—
乳糖發酵試驗	產氣	未產氣	+
丙二酸鹽試驗	藍色	綠色	—
甘露糖醇發酵試驗	黃色，且產氣	紫色或未產氣	+
葡萄糖發酵試驗	黃色，且產氣	紫色或未產氣	+
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
醋酸鹽氧化試驗	藍色	綠色	+
黏液酸鹽利用試驗	黃色	藍色	+
氧化酶試驗	深藍紫色	原色	—
硝酸鹽還原試驗	紅紫色	原色 ^a	+
山梨糖醇發酵試驗	黃色	紫色	+
血清型別試驗	凝集	無凝集	+

a：若無紅紫色時加入少許鋅粉，而有紅紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。

檢驗流程圖

