

行政院衛生署公告

中華民國 102 年 5 月 28 日

署授食字第 1021900644 號

主 旨：修正「食品微生物之檢驗方法－霍亂弧菌之檢驗」，並自即日生效。

依 據：食品衛生管理法第二十五條。

署 長 邱文達

本案依分層負責規定授權局長決行

食品微生物之檢驗方法－霍亂弧菌之檢驗

93 年 8 月署授食字第 0939320313 號公告

102 年 5 月 28 日署授食字第 1021900644 號公告修正

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，鉑鈹或鉻線材質，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。蛋白腴 (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)、胨蛋白胨 (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 (Na ₂ S ₂ O ₃)	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°C 時，注入培養皿，放置隔夜或使用前以 37~45°C 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°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。

2.2.42.4. 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 ₂ HPO 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°C 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°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% 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°C 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°C 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°C 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)

胨蛋白胨 (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 (Na ₂ S ₂ 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 隔夜培養，再另行接種於含 2% 或 3% NaCl 之 TSB 培養液，於 35±2°C 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°C 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°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退出時，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±2°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 µg/mL 和 150 µg/mL 之含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基。經 35±2°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±2°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°C 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°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，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°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°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，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°C 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°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°C 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°C 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 試驗	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 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°C 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°C）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°C 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'-GAACTTATAACCACCCGCG-3'
探針 P：5'-(FAM)-TACTGACAACATCAGTTTTGAAGTCCTCGCTCGT-(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）-CAGCAGCAGATGGTTATGGATTGGCAGGT-（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°C 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 µM 引子 F.....2.0 µL

5 µM 引子 R.....2.0 µL

5 µM 探針.....1.0 µL

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....12.5 µL

檢體 DNA 溶液.....5.0 µL

無菌去離子水.....2.5 µL

總體積.....25.0 µL

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 × 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。

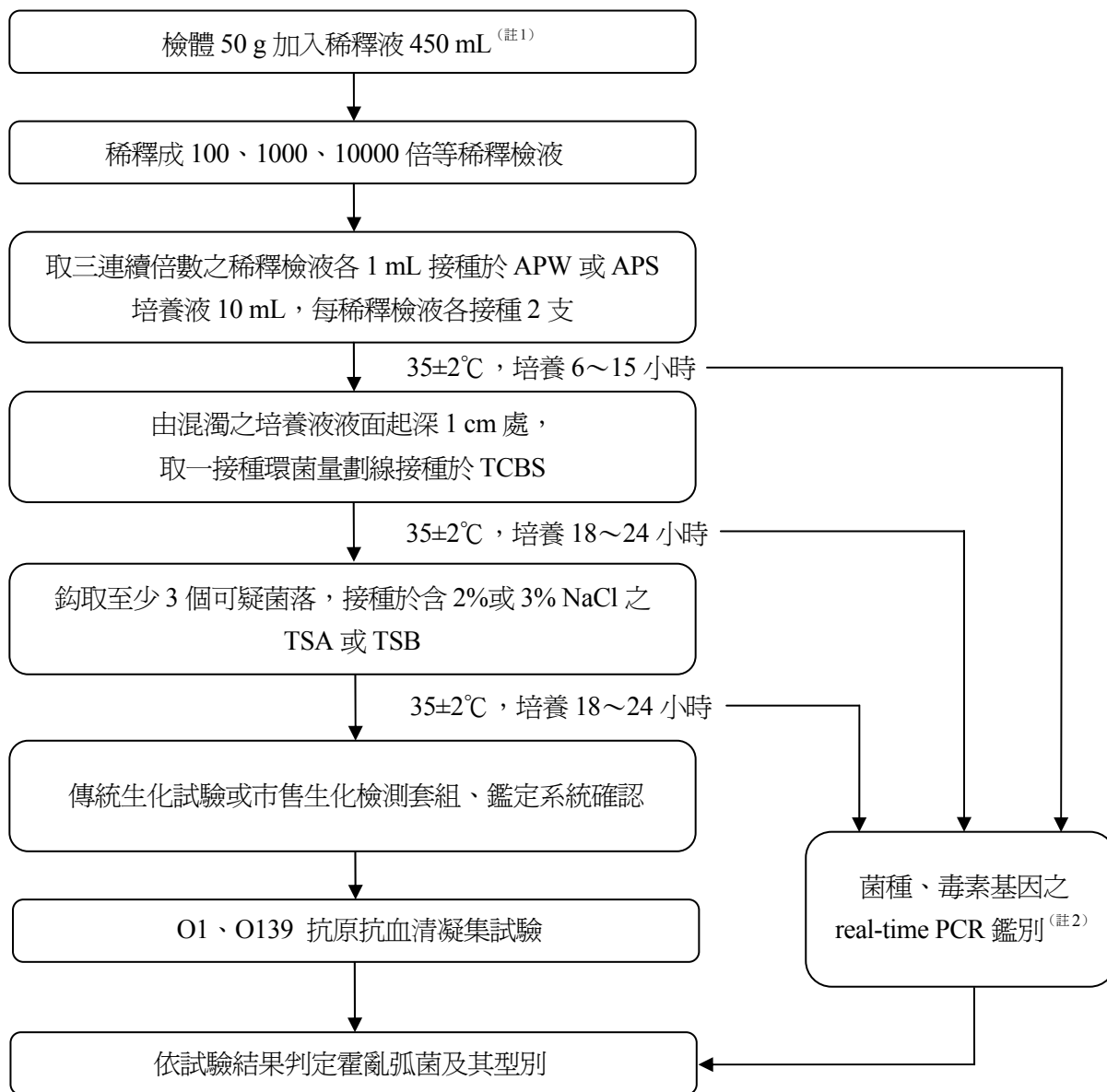
2.7.3. 確認

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。