

食品微生物之檢驗方法—沙門氏桿菌之檢驗
Methods of Test for Food Microbiology - Test of *Salmonella*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中沙門氏桿菌之檢驗。

2. 檢驗方法

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 高壓滅菌釜。

2.2.2 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。

2.2.3 乾熱滅菌器。

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

2.2.5 增菌用容器：500 mL 含蓋之可滅菌廣口瓶，或無菌塑膠(鐵胃)袋。

2.2.6 三角瓶：500 mL。

2.2.7 燒杯：500 mL。

2.2.8 加熱板(Hot plate)：具有磁性攪拌功能。

2.2.9 天平：可稱量到2,000 g 者，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g 者，靈敏度為1 mg。

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

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

2.2.12 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。

2.2.13 吸管輔助器(Pipette aid) 或微量分注器。

2.2.14 吸管或吸管尖：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。

2.2.15 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。

2.2.16 試管：16 × 150 mm、20 × 150 mm、10 × 75 mm 及13 × 100 mm 或其它適用者。

2.2.17 旋渦混合器(Vortex mixer)。

2.2.18 玻璃棒、剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。

2.2.19 燈箱：一般日光燈源，30瓦。

2.2.20 pH 試紙：pH 值適用範圍為6~8。

2.2.21 pH 測定儀。

- 2.2.22 振盪器(Shaker)。
- 2.2.23 無菌濾膜：孔徑0.45 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.24 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑6 × 50 mm 或其他適用者。
- 2.2.25 試藥：碘、碘化鉀、煌綠染料(brilliant green dye)、氯化鎂(magnesium chloride)、孔雀綠草酸鹽(malachite green oxalate)、氰化鉀、半乳糖醇(dulcitol)、乳糖、蔗糖、甲基紅(methyl red)、肌酸(creatine)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、酚紅(phenol red)、氫氧化鈉、氯化鈉、 α -萘酚(α -naphthol)、對-二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethyl aminobenzaldehyde)、氫氧化鉀、甲醛(formaldehyde)、乙醇、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、次氯酸鈉(sodium hypochlorite)、無水乙醇(absolute ethanol)、正戊醇(normal amyl alcohol)、亞硫酸鉀粉末(potassium sulfite powder)、硫酸亞鐵(ferrous sulfate)及鹽酸均採用試藥級，Tergitol anionic 7及 Triton X-100為界面活性劑；木瓜酶(papain)及纖維素酶(cellulase)採用微生物級。

2.2.26 試劑

- 2.2.26.1 5%木瓜酶溶液(5% papain solution)：取木瓜酶5 g 溶於蒸餾水中，使成100 mL，以9,500 rpm 離心10分鐘後，經孔徑0.45 μm 濾膜過濾除菌，注入已滅菌之三角瓶內。須新鮮配製。
- 2.2.26.2 1%纖維素酶溶液(1% cellulase solution)：取纖維素酶1 g 加入蒸餾水中，使成100 mL，溶解後以孔徑0.45 μm 濾膜過濾除菌後於2~5 $^{\circ}\text{C}$ 貯存，並應於2週內使用。
- 2.2.26.3 0.25%酚紅溶液(0.25% phenol red solution)：取酚紅0.25 g 溶於蒸餾水中，使成100 mL。
- 2.2.26.4 1N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉40 g 溶於蒸餾水中，使成1000 mL。
- 2.2.26.5 1N 鹽酸溶液：取鹽酸89 mL 溶於蒸餾水中，使成1000 mL。
- 2.2.26.6 1%煌綠溶液(1% brilliant green solution)：取煌綠染料1 g 溶於水中，使成100 mL，並以孔徑0.45 μm 濾膜過濾。
- 2.2.26.7 0.1%煌綠溶液：取煌綠染料0.1 g 溶於無菌蒸餾水中，使成100 mL。
- 2.2.26.8 0.002%煌綠溶液：取1%煌綠溶液2 mL，加入無菌蒸餾水中，使成1000 mL。

- 2.2.26.9 0.2%溴甲酚紫溶液(0.2% bromcresol purple solution): 取溴甲酚紫0.2 g 溶於無菌蒸餾水中, 使成100 mL。
- 2.2.26.10 0.85%無菌生理食鹽水(0.85% sterile physiological saline solution): 取氯化鈉8.5 g 溶於蒸餾水中, 使成1000 mL, 分裝於試管, 以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.26.11 福馬林化生理食鹽水(Formalinized physiological saline solution): 取氯化鈉8.5 g 溶於蒸餾水中, 使成1000 mL, 以 121°C滅菌15分鐘, 冷卻至室溫, 添加36~38%甲醛溶液6 mL。
- 2.2.26.12 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent): 取對-二甲胺基苯甲醛 5 g 溶於正戊醇75 mL 中, 再徐徐加入鹽酸25 mL, 混合均勻後應呈黃色並須保存於 4°C 冰箱中。
- 2.2.26.13 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagents, VP reagents):
溶液 A: 取 α -萘酚5 g 溶於無水乙醇中, 使成100 mL。
溶液 B: 取氫氧化鉀40 g 溶於蒸餾水中, 使成100 mL。
- 2.2.26.14 甲基紅指示劑 (Methyl red indicator): 取甲基紅0.1 g 溶於乙醇300 mL 後, 再加蒸餾水使成500 mL。
- 2.2.26.15 碘-碘化鉀溶液 (Iodine-potassium iodide solution): 取碘化鉀5 g 溶於5 mL 無菌水, 加入精製碘6 g 攪拌至溶解, 再加無菌水稀釋至20 mL, 避光儲存。本操作務必在抽氣櫃內進行。
- 2.2.26.16 含 0.1% 硫酸月桂酸鈉氯水溶液 (Chlorine solution containing 0.1% sodium lauryl sulfate): 取硫酸月桂酸鈉 1 g 溶於蒸餾水992 mL 後, 加入市售漂白水(約含5.25%次氯酸鈉) 8 mL, 臨用前配製。
- 2.2.26.17 0.5%氰化鉀溶液(0.5% potassium cyanide solution): 取氰化鉀0.5 g 溶於無菌蒸餾水中, 使成100 mL。氰化鉀為劇毒物質, 本操作務必在抽氣櫃內進行。
- 2.2.27 血清
- 2.2.27.1 沙門氏桿菌多價本體(O)抗血清 [*Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum]
- 2.2.27.2 沙門氏桿菌多價鞭毛(H)抗血清 [*Salmonella* polyvalent flagellar (H) antiserum]
- 2.2.27.3 沙門氏桿菌單價本體族群(O)抗血清 [*Salmonella* somatic group (O) antiserum] , 包括 A、B、C₁、C₂、C₃、D₁、D₂、E₁、E₂、E₃、E₄、F、G、H、I 及 Vi。
- 2.2.28 培養基
- 2.2.28.1 乳糖培養液(Lactose broth)

- | | |
|---------------------|---------|
| 牛肉抽出物(beef extract) | 3 g |
| 蛋白朊(peptone) | 5 g |
| 乳糖(lactose) | 5 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終 pH 值為 6.9 ± 0.2。
- 2.2.28.2 無脂乳粉培養液(Nonfat dry milk)
- | | |
|-----------------------|---------|
| 無脂乳粉(nonfat dry milk) | 100 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.28.3 蛋白朊緩衝液 (Buffered peptone water)
- | | |
|---|---------|
| 蛋白朊 (peptone) | 10 g |
| 氯化鈉 (NaCl) | 5 g |
| 磷酸氫二鈉 (Na ₂ HPO ₄) | 3.5 g |
| 磷酸二氫鉀 (KH ₂ PO ₄) | 1.5 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。
- 2.2.28.4 亞硒酸胱胺酸培養液 (Selenite cystine broth, SC)
- | | |
|--|---------|
| 聚蛋白朊(polypeptone) | 5 g |
| 或胰化蛋白朊(tryptone) | |
| 乳糖(lactose) | 4 g |
| 磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄) | 10 g |
| 亞硒酸氫鈉(NaHSeO ₃) | 4 g |
| 胱胺酸(L-cystine) | 0.01 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，取10 mL 或225 mL 分別注入試管或三角瓶內後，再於沸騰水浴上蒸氣加熱10分鐘（加熱時應經常搖動，但不可高壓殺菌），最終 pH 值為7.0 ± 0.2。配製後應當天使用。
- 2.2.28.5 四硫代硫酸鹽培養液(Tetrathionate broth, TT)
- TT 基礎培養液(TT broth base)
- | | |
|--|---------|
| 聚蛋白朊(polypeptone) | 5 g |
| 膽鹽(bile salts) | 1 g |
| 碳酸鈣(CaCO ₃) | 10 g |
| 硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O) | 30 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |

將基礎培養液加熱沸騰，最終 pH 值為 8.4 ± 0.2 。冷卻至 45°C 以下後分取 10 mL 注入試管中，儲藏於冰箱備用。使用前加入碘-碘化鉀溶液 0.2 mL 及 0.1% 煌綠溶液 0.1 mL。

2.2.28.6 Rappaport - Vassiliadis 培養液(RV)

RV 基礎培養液(RV broth base)

胰化蛋白胨(tryptone)	5 g
氯化鈉(NaCl)	8 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.6 g
蒸餾水	1000 mL
氯化鎂溶液 (magnesium chloride solution)	
氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400 g
蒸餾水	1000 mL
孔雀綠草酸鹽溶液 (malachite green oxalate solution)	
孔雀綠草酸鹽 (malachite green oxalate)	0.4 g
蒸餾水	100 mL

量取 RV 基礎培養液 1000 mL，氯化鎂溶液 100 mL 及孔雀綠草酸鹽溶液 10 mL，混合均勻後，分取 10 mL 注入試管，以 115°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 5.5 ± 0.2 。RV 基礎培養液必須於配製當天與氯化鎂溶液及孔雀綠草酸鹽溶液混合成為 RV 培養液。氯化鎂溶液存於棕色瓶中，於室溫下可保存一年；孔雀綠草酸鹽溶液存於棕色瓶中，於室溫下可保存 6 個月。配製完成之 RV 培養液儲存於冰箱中勿超過 1 個月。不建議使用市售乾燥培養基配製本培養液。

2.2.28.7 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基 (Xylose lysine deoxycholate agar, XLD)

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
L-離胺酸(L-lysine)	5 g
木糖(xylose)	3.75 g
乳糖(lactose)	7.5 g
蔗糖(sucrose)	7.5 g
去氧膽酸鈉(sodium deoxycholate)	2.5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	0.8 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	6.8 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
洋菜(agar)	15 g
酚紅(phenol red)	0.08 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度。於50°C水浴中冷卻，最終pH值為7.4±0.2。每培養皿注入約20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

2.2.28.8 海克頓腸內菌培養基(Hektoen enteric agar, HE)

蛋白胨(peptone)	12 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
膽鹽 No.3 (bile salts No.3)	9 g
乳糖(lactose)	12 g
蔗糖(sucrose)	12 g
水楊苷(salicin)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	1.5 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.065 g
酸性復紅(acid fuchsin)	0.1 g
洋菜(agar)	14 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌加熱至沸騰溶解，沸騰勿超過1分鐘。於50°C水浴中冷卻，最終pH值為7.5±0.2。每培養皿注入約20 mL，打開皿蓋約1/2~1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

2.2.28.9 亞硫酸鉍培養基(Bismuth sulfite agar, BS)

聚蛋白胨(polypeptone) 或蛋白胨 (peptone)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	5 g
葡萄糖(glucose)	5 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)	4 g
無水硫酸亞鐵(FeSO_4 ; anhydrous)	0.3 g
亞硫酸鉍[$\text{Bi}_2(\text{SO}_3)_3$]	8 g
煌綠(brilliant green)	0.025 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌加熱至沸騰溶解約1分鐘，不須高壓滅菌。冷卻至45~50°C，最終pH值為7.7±0.2。每培養皿注入約20 mL，打開皿蓋約1/2~1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。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。培養基以當天使用最

佳，最多不得超過48小時，且應貯存於暗處。

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

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	15 g
胰蛋白胨(proteose peptone)	5 g
葡萄糖(glucose)	1 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
硫酸亞鐵(FeSO_4)	0.2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.3 g
酚紅(phenol red)	0.024 g
洋菜(agar)	12 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取約5 mL 注入試管，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，斜面長度約4~5 cm，斜面底部之深度約2~3 cm。

2.2.28.11 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，分取約5 mL 注入試管內，以121°C滅菌15分鐘，最終 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

2.2.28.12 胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth)

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(NaCl)	5 g
葡萄糖(glucose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，取225 mL 倒入500 mL 三角錐瓶，以121°C滅菌15分鐘。最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.28.13 胰化酪蛋白大豆胰化蛋白胨培養液(Trypticase soy-tryptose broth)

胰化酪蛋白大豆培養液粉末 (trypticase soy broth; dehydrated)	15 g
胰化蛋白胨培養液粉末	

- | | |
|------------------------------|---------|
| (tryptose broth; dehydrated) | 13.5 g |
| 酵母抽出物(yeast extract) | 3 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，分取約5mL 注入試管內，以121°C 滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.2 ± 0.2。
- 2.2.28.14 含亞硫酸鉀胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth containing potassium sulfite)
- | | |
|---------------------------------------|---------|
| 亞硫酸鉀(K ₂ SO ₃) | 5 g |
| 胰化酪蛋白大豆培養液 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以121°C 滅菌15分鐘，備用。
- 2.2.28.15 MR-VP 培養液(MR-VP broth)
- | | |
|--|---------|
| 蛋白胰緩衝液粉末
(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 |
- 溶解後，分取約5 mL 注入試管中，以121°C 滅菌12~15分鐘，最終 pH 值為6.9 ± 0.2。
- 2.2.28.16 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基(Simmons citrate agar)
- | | |
|---|---------|
| 氯化鈉(NaCl) | 5 g |
| 檸檬酸鈉(Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇) | 2 g |
| 磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄) | 1 g |
| 磷酸二氫銨(NH ₄ H ₂ PO ₄) | 1 g |
| 硫酸鎂(MgSO ₄) | 0.2 g |
| 溴麝香草藍(bromthymol blue) | 0.08 g |
| 洋菜(agar) | 15 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，分取約5 mL 注入試管中，以121°C 滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.8 ± 0.2。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約4~5 cm，斜面底部深度約2~3 cm。
- 2.2.28.17 尿素培養液(Urea broth)
- | | |
|--|---------|
| 尿素(urea) | 20 g |
| 酵母抽出物(yeast extract) | 0.1 g |
| 磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄) | 9.1 g |
| 磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄) | 9.5 g |
| 酚紅(phenol red) | 0.01 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |

溶解後，經孔徑 0.45 μm 濾膜無菌過濾後，分取 1.5~3.0 mL 濾液注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.2.28.18 尿素培養液(Urea broth) (rapid)

尿素(urea)	20 g
酵母抽出物(yeast extract)	0.1 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	0.095 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	0.091 g
酚紅(phenol red)	0.01 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，經孔徑 0.45 μm 濾膜無菌過濾後，分取 1.5~3.0 mL 濾液注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.2.28.19 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract)	1 g
硫酸銨[(NH_4) $_2$ 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
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.025 g
蒸餾水	1000 mL

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

2.2.28.20 離胺酸鐵培養基(Lysine iron agar, LIA)

蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
葡萄糖(glucose)	1 g
離胺酸鹽酸鹽(L-lysine hydrochloride)	10 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	0.5 g
無水硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; anhydrous)	0.04 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.02 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取約 4 mL 注入試管中，以 121°C 滅菌 12 分鐘，最終 pH 值為 6.7 ± 0.2 。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 2.5 cm，斜面底部之深度約 4 cm。

- 2.2.28.21 離胺酸脫羧酶培養液(Lysine decarboxylase broth)
- | | |
|-------------------------|---------|
| 蛋白朊(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(bromcresol purple) | 0.02 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，分取約5 mL 注入附有螺旋蓋試管中，以 121°C 滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.5~6.8。
- 2.2.28.22 氰化鉀培養液[Potassium cyanide (KCN) broth]
- | | |
|--|---------|
| 聚蛋白朊(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，以 121°C 滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.6 ± 0.2。冷卻後於抽氣櫃內以吸管輔助器配合無菌操作，加入0.5%氰化鉀溶液15 mL，混合均勻，分取1-1.5 mL 注入已滅菌之試管，貯存於冰箱備用，貯存期限不超過兩週。
- 2.2.28.23 酚紅碳水化合物培養液(Phenol red carbohydrate broth)
- | | |
|-----------------------------------|---------|
| 胨蛋白朊 No.3 (proteose peptone No.3) | 10 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5 g |
| 牛肉抽出物(beef extract) | 1 g |
| 酚紅(phenol red) | 0.018 g |
| (或取0.25%酚紅溶液7.2 mL) | |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 取半乳糖醇5 g 溶解於上述之培養液後，分取約2.5 mL 注入裝有發酵管之試管內，以118°C 滅菌10分鐘，最終 pH 值為7.4 ± 0.2。含乳糖或蔗糖10 g 之酚紅碳水化合物培養液配製方法亦同。
- 2.2.28.24 紫色碳水化合物培養液(Purple carbohydrate broth)
- | | |
|-----------------------------------|---------|
| 胨蛋白朊 No.3 (proteose peptone No.3) | 10 g |
| 牛肉抽出物(beef extract) | 1 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5 g |
| 溴甲酚紫(bromcresol purple) | 0.02 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |

操作步驟與2.2.28.23相同，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

- 2.2.28.25 麥康奇培養基(MacConkey agar)
- | | |
|---------------------------|---------|
| 胨蛋白朊(proteose peptone) | 3 g |
| 蛋白朊(peptone) | 17 g |
| 乳糖(lactose) | 10 g |
| 膽鹽 No.3 (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 |
- 加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 121°C 滅菌 15分鐘，最終 pH 值為 7.1 ± 0.2 。
- 2.2.28.26 營養培養液(Nutrient broth)
- | | |
|---------------------|---------|
| 牛肉抽出物(beef extract) | 3 g |
| 蛋白朊(peptone) | 5 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，分取約 10 mL 注入試管，以 121°C 滅菌 15分鐘，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。
- 2.2.28.27 腦心浸出物培養液(Brain heart infusion broth, BHI)
- | | |
|------------------------------------|---------|
| 小牛腦浸出物(calf brain infusion) | 200 g |
| 牛心浸出物(beef heart infusion) | 250 g |
| 胨蛋白朊(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，分裝於試管中，以 121°C 滅菌 15分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。
- 2.2.28.28 含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth containing ferrous sulfate)
- | | |
|-------------------------|---------|
| 硫酸亞鐵(FeSO_4) | 35 mg |
| 胰化酪蛋白大豆培養液 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。
- 2.2.28.29 預增菌培養液(Universal preenrichment broth)
- | | |
|-----------------|-----|
| 胰化蛋白朊(tryptone) | 5 g |
|-----------------|-----|

胨蛋白胨(proteose peptone)	5 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	15 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	7 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
葡萄糖(glucose)	0.5 g
硫酸鎂(MgSO ₄)	0.25 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	0.1 g
丙酮酸鈉(sodium pyruvate)	0.2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.3 ± 0.2。

2.3 檢液之調製與增菌培養

2.3.1 脫水蛋黃、蛋白及全蛋，液狀乳(脫脂乳、含2%脂肪乳，全脂乳及白脫乳)，粉末配方混合物(蛋糕、餅乾、甜甜圈及麵包)，嬰兒配方食品(infant formula)及其他含蛋之口服或管灌食品：冷凍檢體分析前不須解凍。如冷凍檢體須回溫方可切割取樣時，儘速解凍以免傷及沙門氏桿菌或造成競爭性微生物之增殖。樣品可置於45°C以下水浴中，持續搖動，解凍時間不超過15分鐘，或在 2~5°C，解凍時間不超過18小時。在無菌操作下稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋廣口瓶內。檢體為非粉末類，則添加乳糖培養液225 mL。檢體為粉末狀，則先加乳糖培養液15 mL，以已滅菌玻璃棒攪拌均勻，再依續加入乳糖培養液10、10及190 mL，使總添加量為225 mL。攪拌均勻後，將瓶蓋旋緊並在室溫放置60 ± 5分鐘。必要時，以1N 氫氧化鈉溶液或1N 鹽酸溶液將 pH 值調至6.8 ± 0.2。將瓶蓋略旋鬆，於35°C培養24 ± 2小時後供作檢液。

2.3.2 蛋品

2.3.2.1 帶殼蛋：先以刷子清洗蛋表面並瀝乾。浸於含0.1%硫酸月桂酸鈉之氯水溶液約30分鐘。以無菌操作取出蛋黃及蛋白，混合均勻後稱取25 g，置於已滅菌廣口瓶內。添加含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液225 mL 並混合均勻，在室溫靜置 60 ± 5分鐘。先以 pH 試紙測其 pH 值，必要時，以無菌之 1N 氫氧化鈉溶液或1N 鹽酸溶液將 pH 值調至6.8 ± 0.2。於 35°C 培養24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.2.2 全蛋液(均質化者)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌廣口瓶內。添加含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液225 mL 並混合均勻後，續依2.3.2.1 之步驟進行檢液之調製。

2.3.2.3 水煮蛋(雞蛋、鴨蛋及其他)：蛋殼完整者，依2.3.2.1之步驟處理，再以無菌操作取出蛋黃及蛋白，混合均勻後稱取25 g，置於已滅菌廣口瓶內，添加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL 並振盪均勻後，續依2.3.2.1 之步驟進行檢液之調製。

2.3.3 脫脂乳粉

2.3.3.1 即溶脫脂乳粉：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有0.002%煌綠溶液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例0.002%煌綠溶液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置 60 ± 5 分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時，供作檢液。

2.3.3.2 非即溶脫脂乳粉：依2.3.3.1之步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。

2.3.4 全脂乳粉：依2.3.3.1之步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。

2.3.5 酪蛋白

2.3.5.1 乳酸酪蛋白(Lactic casein)：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有預增菌培養液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例預增菌培養液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置 60 ± 5 分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時，供作檢液。

2.3.5.2 酶凝酪蛋白(Rennet casein)：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有乳糖培養液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例乳糖培養液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置 60 ± 5 分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時，供作檢液。

2.3.5.3 酪蛋白鈉(Sodium caseinate)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌均質杯內，添加乳糖培養液225 mL 後，混合均勻。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例乳糖培養液之廣口瓶中，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並測 pH 值。必要時，調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.6 黃豆粉：依2.3.5.2之步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。

2.3.7 含蛋製品(麵條、蛋捲、通心麵、義大利麵條)、乾酪、生麵糰、沙拉(含火腿、蛋、雞肉、鮭魚、火雞肉)、生鮮、冷

凍、或乾燥水果及蔬菜、堅果核仁、甲殼類(蝦、螃蟹、小龍蝦、龍蝦)及魚類：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 45°C 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15分鐘，或在 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌之均質杯內。添加乳糖培養液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.8 乾酵母：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋廣口瓶內。添加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL。混合均勻，將瓶蓋旋緊，在室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.9 糖霜及甜點加覆料(Frosting and topping mixes)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內。添加營養培養液225 mL 並混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，並於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.10 香辛料

2.3.10.1 黑胡椒、白胡椒、芹菜片及種子、辣椒粉、小茴香、紅椒、香芹碎片、迷迭香、芝麻、麝香草及蔬菜片等：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內，添加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL，並混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.10.2 洋蔥片、洋蔥粉、大蒜片：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內。添加含亞硫酸鉀胰化酪蛋白大豆培養液225 mL 後依2.3.10.1調製檢液。

2.3.10.3 眾香子、肉桂、丁香及牛至草香辛料：眾香子、肉桂及牛至草香辛料以檢體與胰化酪蛋白大豆培養液為1:100的比例、丁香以1:1000，其它葉狀調味料則至少以1:10的比例予以混合，續依2.3.10.1步驟製備檢液。

2.3.11 糖果及糖衣(包括巧克力)：以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌均質杯內，添加無脂乳粉培養液225 mL，均質2分鐘。將此溶液倒入已滅菌含蓋廣口瓶內，將瓶蓋旋緊後於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。必要時，調整 pH 值至 6.8 ± 0.2 後，添加1%煌綠溶液0.45 mL，混合均勻，並將瓶蓋旋鬆後，於 35°C 培養

24 ± 2 小時後，供作檢液。

- 2.3.12 椰子：以無菌操作稱取檢體 25 g，置入已滅菌之含蓋廣口瓶內。添加乳糖培養液 225 mL，將瓶蓋旋緊並混合均勻，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並測 pH 值。必要時，將 pH 值調至 6.8 ± 0.2。添加業經蒸氣加熱 15 分鐘之界面活性劑 Tergitol anionic 7 2.25 mL，混合均勻。或添加經蒸氣加熱 15 分鐘之 Triton X-100 (使用 Triton X-100 時，只須 2 至 3 滴)。將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.13 食品染料及食品著色劑：當染料之 pH 值 ≥ 6.0 時，使用 2.3.1 之方法製備檢液。染料之 pH 值 < 6.0 時，以無菌操作稱取檢體 25 g，置入已滅菌含蓋廣口瓶，添加不含煌綠之 TT 培養液 225 mL。將瓶蓋旋緊，混合均勻，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘，調整 pH 值至 6.8 ± 0.2。添加 0.1% 煌綠溶液 2.25 mL，混合均勻。將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，依 2.4.3 直接劃線於選擇性培養基。
- 2.3.14 明膠：以無菌操作稱取檢體 25 g，置入無菌含蓋廣口瓶內。添加乳糖培養液 225 mL 及 5% 木瓜酶溶液 5 mL 後，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。混合均勻，並以試紙測 pH 值。必要時，將 pH 值調至 6.8 ± 0.2。將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.15 肉、肉類代用品 (如素雞等)、肉類副產品、動物成分 (如膠原蛋白等)、魚粉、肉粉及骨粉：以無菌操作稱取檢體 25 g，置入已滅菌之均質杯內。添加乳糖培養液 225 mL，均質 2 分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。檢體為粉狀或磨碎狀不需均質時，添加乳糖培養液並充分混合均勻後，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。以試紙測 pH 值，必要時，將 pH 值調至 6.8 ± 0.2。添加以蒸氣加熱 15 分鐘之 Tergitol Anionic 7 或 Triton X-100，儘量減少用量，加至會產生泡沫即可，最多加至 2.25 mL，實際用量視檢體成分而定。粉狀肝臟及腎臟類製品等，不需添加界面活性劑。將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.16 蛙腿：將 15 對蛙腿或分別來自 15 對之蛙腿 15 隻 (平均每支重量在 25 g 以上時) 置於無菌塑膠袋內，上覆乳糖培養液，檢體與培養液之比例為 1 : 9 (g/mL)。混合均勻，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，以試紙測試 pH 值，必要時，將 pH 值調至 6.8 ± 0.2。於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

- 2.3.17 兔檢體：將兔檢體置入無菌塑膠袋內，上覆乳糖培養液，檢體與培養液之比例為1：9。混合均勻，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，以試紙測試pH值，必要時，將pH值調至 6.8 ± 0.2 。於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.18 關華豆膠(Guar gum)：取乳糖培養液225 mL 及已除菌之1%纖維素酶溶液2.25 mL 至已滅菌含蓋之廣口瓶中。在以磁鐵攪拌混勻之過程中，迅速加入檢體25 g，充分攪拌後，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後(無需調整pH值)，將瓶蓋旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.19 柳橙汁(已滅菌及未滅菌)、未過濾之蘋果汁(已滅菌及未滅菌)、已過濾之蘋果汁(已滅菌)：以無菌操作量取檢體25 mL，置於已滅菌且盛有預增菌培養液225 mL 之含蓋廣口瓶中，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘(無需調整pH值)，續將廣口瓶之蓋子旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。
- 2.3.20 網紋甜瓜(Cantaloupe)：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 45°C 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15分鐘，或在 $2\sim 5^\circ\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。添加預增菌培養液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘(無需調整pH值)，續將廣口瓶之蓋子略旋鬆，於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。檢體為完整網紋甜瓜時，將檢體置於無菌塑膠袋內，添加足夠之預增菌培養液，使檢體浮起。添加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如1500 g之檢體可能需要約2250 mL之培養液。必要時，再添加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封。於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後(無需調整pH值)，於 35°C 培養 24 ± 2 小時，供作檢液。
- 2.3.21 芒果(Mango)：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 45°C 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15分鐘，或在 $2\sim 5^\circ\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。添加蛋白胰緩衝液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並調整pH值至 6.8 ± 0.2 。將

瓶蓋略旋鬆，並於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。檢體為完整芒果時，將檢體置於無菌塑膠袋內，添加足夠之蛋白胨緩衝液，使檢體浮起。添加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如500 g之檢體可能需要約750 mL之培養液。必要時，再添加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘。必要時，調整pH值至 6.8 ± 0.2 。於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.22 蕃茄(Tomato)：檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。添加蛋白胨緩衝液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後，混勻並調整pH值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋略旋鬆，並於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。檢體為完整蕃茄時，將檢體置於無菌塑膠袋內，添加足夠之預增菌培養液，使檢體浮起。添加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如300 g之檢體可能需要約450 mL之培養液。必要時，再添加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封。於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後(無需調整pH值)，於 35°C 培養 24 ± 2 小時，供作檢液。

2.3.23 塗抹物(Swab) 檢體：以無菌操作折斷塗抹物木柄或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹棒之頭部置於無菌含蓋試管內，添加蛋白胨緩衝液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。取溶出液1 mL置於已盛裝蛋白胨緩衝液9 mL之已滅菌含蓋之試管內，置於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。或以無菌操作折斷塗抹物木柄、或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹物之頭部置於已盛裝蛋白胨緩衝液10 mL之已滅菌含蓋試管內，置於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.3.24 其他檢體：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌均質杯內，添加蛋白胨緩衝液225 mL後，均質攪拌2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌含蓋之廣口瓶內。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 60 ± 5 分鐘後混合均勻。當檢體中細菌因長期冰凍或其他原因受損，則可使用乳糖培養液代替蛋白胨緩衝液。必要時，調整pH值至 6.8 ± 0.2 。將瓶蓋旋鬆置於 35°C 培養 24 ± 2 小時後，供作檢液。

2.4 選擇性增菌培養與分離

2.4.1 檢液接種至選擇性增菌培養液：將2.3節檢液混合均勻，依下列操作：

2.4.1.1 檢體為關華豆膠：各吸取檢液1 mL 至 SC 及 TT 培養液各 10 mL 中，混合均勻。

2.4.1.2 檢體為其他食品：吸取檢液0.1 mL 至 RV 培養液10 mL 中，另吸取檢液1 mL 至 TT 培養液10 mL 中，混合均勻。

2.4.2 選擇性增菌培養：

2.4.2.1 檢體為高度污染食品：將 RV 培養液置於42°C 水浴培養24 ± 2小時。另將 TT 培養液置於43°C 水浴培養24 ± 2小時。

2.4.2.2 檢體為低度污染食品 (關華豆膠除外)：將 RV 培養液置於 42°C 水浴培養24 ± 2小時。另將 TT 培養液置於35°C 培養24 ± 2小時。

2.4.2.3 檢體為關華豆膠：將 SC 及 TT 培養液置於35°C 培養24 ± 2 小時。

2.4.3 分離培養：分別自2.4.2節之 RV、SC 及 TT 增菌培養液中取一接種環量，在 HE、XLD 及 BS 培養基表面作劃線後，於35°C 培養24 ± 2小時，觀察所形成菌落型態。

2.4.4 在各培養基中，典型沙門氏桿菌菌落之性狀如下：

2.4.4.1. HE 培養基：呈藍綠或藍色菌落，有(或無)黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤之黑色中心或黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有(或無)黑色中心。

2.4.4.2. XLD 培養基：呈粉紅色菌落，有(或無)黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤黑色中心或呈黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有(或無)黑色中心。

2.4.4.3. BS 培養基：典型菌落為褐色、灰色或黑色，有時會產生金屬光澤。菌落周圍之培養基顏色，起初為褐色，隨著培養時間加長而轉為黑色並產生光環效應。部份非典型菌落會形成綠色菌落，周圍培養基色澤稍微變深或不變色。於 BS 培養基上未發現典型菌落，須再於35°C 培養24 ± 2小時。

2.4.5 自 HE、BS 及 XLD 培養基中各挑二個或二個以上之典型菌落，無典型菌落時，挑取二個或二個以上之非典型菌落，每一菌落同時接種於 TSI 及 LIA 斜面培養基，並同時進行斜面劃線及穿刺接種。以無菌接種針輕觸菌落的中心並接種於 TSI 斜面及底部，穿刺於 LIA 底部兩次並於斜面劃線〔離胺酸脫羧反應為專性厭氧性(strictly anaerobic)，故 LIA 培養基斜面底部之深度約4 cm〕。

2.4.6 將已接種菌之 TSI 及 LIA 斜面培養基於 35°C 培養 24 ± 2 小時，培養時，將試管蓋旋鬆。典型沙門氏桿菌在 TSI 培養基斜面呈紅色反應(鹼性)，底部呈黃色(或無色)反應(酸性)，有培養基顏色變黑或無硫化氫產生；在 LIA 培養基之底部呈紫色反應(鹼性)，大多數沙門氏桿菌在 LIA 培養基會產生硫化氫而呈黑色。凡是在 LIA 斜面培養基底部產生鹼性的菌株須保留作生化及血清學試驗；在 LIA 培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生鹼性斜面及酸性底部者亦須保留菌株作生化及血清學試驗。在 LIA 斜面培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生酸性斜面及酸性底部之菌株則可以丟棄。如 TSI 斜面培養基上菌株呈非沙門氏桿菌典型反應，則重複2.4.5之步驟，鉤取更多可疑菌落接種於 TSI 及 LIA 培養基。

2.4.7 針對以下疑似沙門氏桿菌菌株，進行生化及血清學試驗。

2.4.7.1. SC 或 RV 增菌培養液經由劃線培養及穿刺培養步驟，於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株，至少取3株；以及 TT 增菌培養液經由劃線培養及穿刺培養步驟，於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株，至少取3株。

2.4.7.2. 當 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之3株菌株，並非來自同一組分離培養基時，則必須再檢測其它於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株。每25 g 檢體至少須檢測於 TSI 斜面培養基呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株6株。

2.5 鑑定試驗

2.5.1 混合菌株(Mixed culture)之純化：將 TSI 斜面培養基上未純化菌株劃線培養於麥康奇、HE 或 XLD 培養基，於 35°C 培養 24 ± 2 小時。觀察是否有疑似沙門氏桿菌菌落：

2.5.1.1. 麥康奇培養基：典型菌落為透明無色，有時會有黑色中心。

2.5.1.2. HE 培養基：如2.4.4.1。

2.5.1.3. XLD 培養基：如2.4.4.2。

至少接種2株疑似沙門氏桿菌菌落於 TSI 及 LIA 斜面培養基，步驟如2.4.5及2.4.6。

2.5.2 純菌株(Pure culture)

2.5.2.1. 尿素酶試驗(傳統方法)：以無菌接種針挑取 TSI 斜面培養基上可疑菌株，接種於尿素培養液內，於 35°C 培養 24 ± 2 小時。由於未接種之尿素培養液偶爾會轉變為紫紅色，故試驗時應包括未接種之培養液作為對照用。培養液由

橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏桿菌為負反應。

- 2.5.2.2. 尿素酶試驗(快速法):自含可疑菌株之 TSI 斜面培養基上鉤取兩接種環量菌種至供快速測試用之尿素培養液內，於 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水浴培養2小時。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏桿菌為負反應。

尿素酶試驗為負反應者，應自其 TSI 培養基中鉤菌，作以下之血清及生化試驗。

2.5.3 本體抗血清試驗(Serological somatic test)

2.5.3.1 多價本體(O)抗血清試驗[Polyvalent somatic (O) test]

將玻片或塑膠培養皿劃出約 1×2 cm 之兩區。自經培養24~48小時之 TSI 培養基斜面鉤取一接種環菌量至0.85%生理食鹽水2 mL，混合均勻。分別取菌株懸浮液各一滴，滴入玻片上兩區部位。滴一滴生理食鹽水在玻片之一區，滴一滴多價本體抗血清在玻片另一區。以無菌接種環或接種針將玻片上菌液與生理食鹽水(或本體抗血清)混合均勻。將玻片前後搖動約1分鐘後在光源上觀察結果：

正反應：菌液與本體抗血清產生凝集，且菌液與生理食鹽水無凝集者。

負反應：菌液與本體抗血清，以及菌液與生理食鹽水均無凝集者。

非特異型反應：兩者均產生凝集。

2.5.3.2 單價本體族群(O)抗血清試驗[Monovalent somatic(O)group test]

如2.5.3.1節，取菌株懸浮液，利用單價本體族群(O)抗血清(包括 Vi 抗血清)進行試驗。正反應者應產生凝集現象，負反應者則無。將與 Vi 抗血清凝集之菌株，配製成濃稠菌株懸浮液，於沸水中加熱20~30分鐘後，冷卻。將經加熱、冷卻處理之濃稠菌株懸浮液再與本體族群抗血清 C₁、D、Vi 作用。菌株懸浮液於加熱處理前與 Vi 抗血清呈凝集反應，且加熱後不與 Vi 抗血清呈凝集但與族群抗血清 D 凝集者可能為 *Salmonella typhi*；加熱前與 Vi 抗血清呈凝集，且加熱後不與 Vi 抗血清呈凝集但與族群抗血清 C₁凝集者可能為 *Salmonella paratyphi C*；經加熱處理之菌株懸浮液仍與 Vi 抗血清呈凝集反應，而不與其它單價本體族群抗血清凝集之菌株可能不是沙門氏桿菌。能與任何單價本體族群抗血清凝集之菌株為單價本體族群(O)抗血清正反應；不能與

任何單價本體族群(O)抗血清凝集者為單價本體族群(O)抗血清負反應。

2.5.4 多價鞭毛(H)血清試驗[Serological polyvalent flagellar (H) test]

將尿素酶負反應之可疑沙門氏桿菌菌株自 TSI 斜面培養基中接種至 BHI 培養液中，並於35°C培養4~6小時，或於胰化酪蛋白大豆胰化蛋白胨培養液中培養24 ± 2小時。取上述培養液5 mL，加入福馬林化生理食鹽水2.5 mL，混合均勻。將多價鞭毛抗血清0.5 mL 置於試管 (13 × 100 mm 或10 × 75 mm) 內，並添加上述福馬林化菌株培養液0.5 mL。以福馬林化生理食鹽水0.5 mL 與福馬林化菌株培養液0.5 mL 混合，作為對照組。將上述混合液放入水浴(48~50°C)培養，每隔15分鐘觀察一次至1小時後，判讀最後結果。正反應為測試組呈凝集而對照組無凝集；負反應為測試組及對照組均無凝集；非特異型反應為測試組及對照組均有凝集。

2.5.5 生化試驗：自尿素酶負反應之 TSI 培養基鈎菌，作以下試驗。

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

於 LIA 培養基之試驗結果符合典型沙門氏桿菌之反應者，不需重複此試驗。鈎菌接種於離胺酸脫羧酶培養液，旋緊試管蓋後，於35°C培養48 ± 2小時，每隔24小時觀察一次。培養液維持紫色者為正反應，由紫色變為黃色者為負反應，沙門氏桿菌應為正反應。培養液變為非紫非黃色時，則加數滴0.2%溴甲酚紫溶液後再行觀察。

2.5.5.2 半乳糖醇利用試驗(Dulcitol utilization test)

鈎菌接種於酚紅半乳糖醇培養液或紫色半乳糖醇培養液並將試管旋鬆，於35°C培養24小時後開始觀察，直至48 ± 2小時。培養液變為黃色並(或)產生氣體者為正反應，否則為負反應，大部分沙門氏桿菌為正反應。

2.5.5.3 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)：鈎菌接種於胰化蛋白胨培養液，於35°C培養24 ± 2小時後，進行下列試驗：

2.5.5.3.1 氰化鉀試驗(KCN test)：鈎菌接種於氰化鉀培養液中，以橡皮塞封緊試管口，於35°C培養24小時後開始觀察直至48 ± 2小時。培養液由清澈變為混濁者為正反應，否則為負反應。大部分沙門氏桿菌為負反應。氰化鉀為劇毒物質，操作時須小心。

2.5.5.3.2 丙二酸鹽試驗(Malonate test)：鈎菌接種於丙二酸鹽培養液，於35°C培養24小時後開始觀察直至48 ± 2小時。培養液由綠色變為藍色者為正反應，維持綠色者為負反應

- ，大部分沙門氏桿菌為負反應。
- 2.5.5.3.3 吲哚試驗(Indole test)：取胰化蛋白胨培養液5 mL 置入空試管，加柯瓦克氏試劑0.2~0.3 mL，上層呈深紅色或紫色者為正反應。大部分沙門氏桿菌為負反應。將中間色如橘色或粉紅色者記錄為±。
- 2.5.5.3.4 沙門氏桿菌之鞭毛抗血清試驗：如尚未進行鞭毛抗血清試驗者可在此補作。
- 2.5.5.3.5 將吲哚試驗為正反應，鞭毛抗血清試驗為負反應，或氰化鉀試驗為正反應，離胺酸脫羧酶試驗為負反應之菌株判定為非沙門氏桿菌。
- 2.5.6 其它生化反應：菌株與表一中試驗1至10反應結果相符者為“沙門氏桿菌”；菌株具鞭毛抗血清凝集反應，但與沙門氏桿菌生化反應不符者，需依2.5.1先行純化，再自2.5.2重新測試。菌株與表一所列試驗1至10之沙門氏桿菌典型反應結果不符者，繼續進行下列生化反應：
- 2.5.6.1 乳糖發酵試驗 (Lactose fermentation test)：將菌株接種於酚紅乳糖培養液或紫色乳糖培養液，於35°C培養24小時後開始觀察直至48±2小時，產酸(顏色變黃)並有氣體產生者為正反應；只有產酸者亦視為正反應。大部份的沙門氏桿菌為負反應。將乳糖試驗為正反應之非沙門氏桿菌菌株丟棄，惟在 TSI 培養基上呈酸性反應，並在 LIA 培養基上呈正反應，或丙二酸鹽培養基上呈正反應之菌株保留，進行下列試驗，以判定是否為 *S. arizonae*。
- 2.5.6.2 蔗糖發酵試驗(Sucrose fermentation test)：將菌株接種於酚紅蔗糖培養液或紫色蔗糖培養液，再依2.5.6.1之步驟培養及觀察。將正反應之菌株丟棄；惟在 TSI 培養基上呈酸性反應，且在 LIA 培養基上呈正反應之菌株則保留。
- 2.5.6.3 MR-VP 試驗：鈎菌接種於 MR-VP 培養液，置於35°C培養48±2小時。
- 2.5.6.3.1 歐普氏試驗(VP test)：取培養48小時菌液1 mL 至另一試管中(剩餘之 MR-VP 培養液於35°C再培養48±2小時)，加入歐普氏試劑之溶液 A 約0.6 mL 並振搖均勻。再添加溶液 B 約0.2 mL，並振搖均勻，加入少許肌酸以加速反應。4小時後觀察結果，呈現粉紅至鮮紅色者為正反應，大部份沙門氏桿菌為負反應。
- 2.5.6.3.2 甲基紅試驗(MR test)：取已培養96小時菌液5 mL 至試管中，加入甲基紅指示劑5至6滴，立即觀察反應結果，培養液呈紅色者為正反應，呈黃色者為負反應。大部份

沙門氏桿菌為正反應。

將氰化鉀試驗呈正反應，歐普氏試驗呈正反應，甲基紅試驗呈負反應之非沙門氏桿菌丟棄。

2.5.6.4 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鈎菌接種於辛蒙斯檸檬酸鹽培養基，須在斜面上作劃線及穿刺培養，於35°C培養96±2小時。斜面上有菌體生長且培養基顏色由綠色變為藍色者為正反應，大部份沙門氏桿菌為正反應。

2.6 判定：沙門氏桿菌陽性者，應符合表一所列之結果。與表二之結果相同者，則被歸類為非沙門氏桿菌。菌株不是以上二類者，則須進行其他試驗(註)。

註：可依參考文獻(Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York.)進行其他試驗。

表一. 沙門氏桿菌之生化及血清反應

試驗或基質	正反應(+)	負反應(-)	沙門氏桿菌之反應 ^a
1. 葡萄糖(TSI)	黃色底部	紅色底部	+
2. 離胺酸脫羧酶試驗(LIA)	紫色底部	黃色底部	+
3. 硫化氫 (TSI 和 LIA)	變黑	無變黑	+
4. 尿素酶試驗	紫紅色	顏色不變	-
5. 離胺酸脫羧酶培養液	紫色	黃色	+
6. 酚紅 (或紫色) 半乳糖醇培養液	黃色，產氣	顏色不變，不產氣	+ ^b
7. 氰化鉀培養液	混濁(生長)	澄清(不生長)	-
8. 丙二酸鹽培養液	藍色	顏色不變	- ^c
9. 吡啶試驗	表面呈深紅色或紫色	表面呈黃色	-
10. 多價本體及鞭毛血清試驗	凝集	無凝集	+
11. 酚紅 (或紫色) 乳糖及蔗糖培養液	黃色，產氣	不產氣，顏色不變	- ^c
12. 酚紅 (或紫色) 蔗糖培養液	黃色，產氣	不產氣，顏色不變	-
13. 歐普氏試驗	粉紅或紅色	顏色不變	-
14. 甲基紅試驗	紅色	黃色	+
15. 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基	生長，藍色	不生長，顏色不變	V

a. “+”表示90%以上在1~2天內均為正反應，“-”表示90%以上在1~2天內均為負反應；“V”表示不一定。

b. 大部分的 *S. arizonae* 為負反應。

c. 大部分的 *S. arizonae* 為正反應。

表二. 非沙門氏桿菌菌株之判定標準

試驗或基質	結果
1. 尿素酶	正反應(紫紅色~紅色)
2. 吲哚試驗及 多價鞭毛抗血清試驗	正反應(表面呈深紅色或紫色) 負反應(無凝集)
3. 離胺酸脫羧酶及 氰化鉀培養液	負反應(黃色) 正反應(混濁)
4. 酚紅(或紫色)乳糖培養液	正反應(黃色, 產氣) ^{a,b}
5. 酚紅(或紫色)蔗糖培養液	正反應(黃色, 產氣) ^b
6. 氰化鉀培養液 歐普試驗及 甲基紅試驗	正反應(混濁) 正反應(粉紅至紅色) 負反應(黃色)

a. 測試丙二酸鹽試驗為陽性之菌株須再試驗是否為 *S. arizonae*

b. 如 LIA 為正反應之菌株不應丟棄, 應繼續測試看是否為沙門氏桿菌。

- 2.7 可參考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, 惟檢驗結果有爭議時, 應以傳統方法為準, 但不能取代血清學試驗。菌株經商業生化套組鑑定為疑似沙門氏桿菌, 仍須進行本體族群(O)抗血清試驗及鞭毛血清試驗, 如二者均為正反應, 則判定為沙門氏桿菌陽性。