



101年度「中藥檢驗分析實務訓練」 初階課程

微生物檢驗SOP實務訓練

報告機構：財團法人中央畜產會

報告人：陳月娥

連絡電話：08-7230341-8226

中華民國101年06月20日



講課內容

- 參考依據
- SOP解說



參考依據

- 依據行政院衛生署100年編印-中華藥典第七版





SOP解說

項 目	檢 驗 方 法
<p>抑菌試驗(預試驗)</p>	<p>行政院衛生署中華藥典編修委員會。2010。中華藥典第七版,附錄柒、特殊檢驗法(7005)微生物限量檢驗法,第109~112頁,行政院衛生署,台北。</p>
<p>好氧性微生物總數</p>	<p>行政院衛生署中華藥典編修委員會。2010。中華藥典第七版,附錄柒、特殊檢驗法(7006)好氧性微生物總數,第113頁,行政院衛生署,台北。</p>
<p>酵母菌與黴菌總數</p>	<p>行政院衛生署中華藥典編修委員會。2010。中華藥典第七版,附錄柒、特殊檢驗法(7006)酵母菌與黴菌總數,第113頁,行政院衛生署,台北。</p>
<p>大腸桿菌</p>	<p>行政院衛生署中華藥典編修委員會。2010。中華藥典第七版,附錄柒、特殊檢驗法(7007.1)大腸桿菌,第113頁,行政院衛生署,台北。</p> <p>生化鑑定：<u>IMViC / VITEK 2 COMPACT 30</u></p>
<p>沙門氏菌</p>	<p>行政院衛生署中華藥典編修委員會。2010。中華藥典第七版,附錄柒、特殊檢驗法(7007.2)沙門氏菌,第114頁,行政院衛生署,台北。</p> <p>生化鑑定：<u>API 20E生化套組 / VITEK 2 COMPACT 30</u></p>



SOP撰寫

一、目的

二、範圍

三、內容：

包括-儀器設備、試劑配製

培養基、操作流程

四、參考文獻

五、備註：檢驗紀錄表



儀器設備

- 無菌操作台
- 乾熱滅菌器：玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達 170°C 以上，並維持該溫度 1 小時以上。
- 高壓滅菌釜：培養基及稀釋液等不能以乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用。滅菌溫度 121°C (約 15 lb/in^2 、 1kg/cm^2)，並能維持15分鐘以上。
- 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。
- 吸管輔助器(Pipette aid) 或微量分注器及吸管。
- 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈷或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 試管： $16\times 125\text{mm}$ 、 $13\times 100\text{mm}$ 試管或其他合適者。
- 玻璃棒、剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- pH 測定儀及pH 試紙
- 振盪器(Shaker)。
- 電子天平：可稱量到2,000g，靈敏度可達 $\pm 0.1\text{g}$ 。
- 精密天平：可稱量至120g，靈敏度可達 $\pm 1\text{mg}$ 。
- 載玻片及蓋玻片



培養基

■ 好氧性微生物總數及酵母菌與黴菌總數

- 大豆分解蛋白質－乾酪素培養基 (Soybean-Casein Digest Medium)、大豆分解蛋白質－乾酪素瓊脂培養基 (Soybean-Casein Digest Agar Medium)、大豆卵磷脂消化乾酪素-油酸聚醇山梨酯20培養基 (Fluid Casein Digest-Soy Lecithin-Polysorbate 20 Medium)、油酸聚醇山梨酯、平板計數培養基 (Plate Count Agar)

■ 大腸桿菌

- 乳糖培養基 (Fluid Lactose Medium)、馬康奇瓊脂培養基 (MacConkey Agar Medium)、伊紅亞甲藍瓊脂培養基 (Levine's Eosin-Methylene Blue Agar Medium, L-EMB)

■ 沙門氏菌

- 乳糖培養基 (Fluid Lactose Medium)、亞硒酸鹽胱胺酸培養基 (Fluid Selenite Cystine Medium)、四硫磺酸鹽培養基 (Fluid Tetrathionate Medium)、煌綠瓊脂培養基 (Brilliant Green Agar Medium)、亞硫酸鉍瓊脂培養基 (Bismuth Sulfite Agar Medium)、木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基 (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar Medium)、三糖鐵瓊脂培養基 (Triple Sugar-Iron Agar Medium)。



抑菌試驗(預試驗)

- 秤取檢品10.0 g，加入大豆分解蛋白質—乾酪素培養基（Soybean-Casein Digest Medium）或乳糖培養基，使全量為100 mL，取標準菌大腸桿菌（*Escherichia coli*）及沙門氏桿菌（*Salmonella*）等菌種，加入約 10^{-3} 之菌液1 mL，再依試驗操作進行。試驗結果，均應有增殖現象。
- 若試驗結果某菌種於其接種之培養基中不生長，則該部分檢驗結果無效。



抑菌試驗(預試驗)-續

- 所有檢驗方法皆即須採下述任一處理法調整之後再重新執行該試驗：
- 1. 增加菌種稀釋液之量；但檢品量不變。
- 2. 於菌種稀釋液中加入適量之不活化劑-如培養基可加入大豆卵磷脂0.5%或油酸聚醇山梨酯20 4.0%，以抵消檢品中所含抑菌物質。
- 採1及2節方法處理，以抵消檢品中所含之抑菌作用；再依試驗操作進行。



好氧性微生物總數檢驗方法 - 培養皿法

- 秤取檢品10.0 g，加入pH 7.2大豆分解蛋白質—乾酪素培養基（Soybean-Casein Digest Medium），使全量為100 mL，並做一系列稀釋。
- 將每個稀釋倍數之稀釋液各吸取1.0 mL，分別置入二個已滅菌之培養皿中，迅速各加已先溶化並冷卻至45°C之大豆分解蛋白質—乾酪素瓊脂培養基（Soybean-Casein Digest Agar Medium）15~20 mL。
- 於室溫下凝固，倒置於30~35°C培養48至72小時後。
- 計算菌落數（菌落數落在30至300個之間者進行計算）。
- 若1：10之檢品稀釋液中無菌落產生，表示此檢品每g或每mL 檢品之微生物總數為10個以下。



酵母菌與黴菌總數

- 秤取檢品10.0 g，加入大豆分解蛋白質—乾酪素培養基（Soybean-Casein Digest Medium），使全量為100 mL，並做一系列稀釋。
- 將每個稀釋倍數之稀釋液各吸取1.0 mL，分別置入三個已滅菌之培養皿中，迅速各加已先溶化並冷卻至45°C之馬鈴薯葡萄糖洋菜培養（Potato Dextrose Agar Medium）18~20 mL。
- 於室溫下凝固，置於20~25°C培養5日後。
- 計算菌落數（菌落數落在15至150個之間者進行計算）。
- 若1：10之檢品稀釋液中無菌落產生，表示此檢品每g或每mL 檢品之微生物總數為10個以下。



大腸桿菌檢驗方法

- 取檢品10mL或10g，加乳糖培養基使成100mL，混合均勻，於30~35°C培養24至48小時。
- 若有菌落產生（混濁），則以接種環沾取菌液，劃線接種於麥康奇瓊脂培養基之表面，於30~35°C培養24至48小時。觀察菌落型態，典型大腸桿菌菌落為磚紅色菌落圍有膽汁沉澱環。若無典型菌落即表示此檢品符合無大腸桿菌之規定。
- 若麥康奇瓊脂培養基有可疑菌落，再接種於伊紅亞甲藍瓊脂培養基表面，作劃線培養於30~35°C培養24至48小時。觀察菌落之外觀於反射光下有特殊光澤於透射光下為藍黑色菌落。
- 作革蘭氏染色並鏡檢，其結果若呈革蘭陰性桿菌。若無典型菌落即表示此檢品符合無大腸桿菌之規定。

特殊培養基	麥康奇瓊脂培養基	伊紅亞甲藍瓊脂培養基
菌落特徵	磚紅色、圍有膽汁沈澱環	反射光下有特殊光澤於，透射光下為藍黑色菌落
格蘭氏染色	陰性桿菌	陰性桿菌



大腸桿菌檢驗方法（續）

- 自每一片伊紅亞甲藍瓊脂培養基（Levine Eosine-Methylene Blue Agar Medium）培養基上取2個可疑菌落或比較可疑之菌落移殖於平板計數培養基（Plate Count Agar）斜面上，並於35°C培養18~24小時，以備生化試驗（IMViC試驗）。
- IMViC試驗：吲哚試驗（Indole Test）、歐普氏試驗（VP Test）、甲基紅試驗（MR Test）、檸檬酸鹽利用試驗（Citrate Utilization Test）
- 自每一片L-EMB培養基上取2個可疑菌落或比較可疑之菌落移殖於PCA培養基斜面上，35°C培養18~24小時，以進行VITEK2 生化試驗鑑定系統。



沙門氏桿菌檢驗方法

- 取檢品10mL或10g，加乳糖培養基使成100mL，混合均勻，於30~35°C培養24至48小時。
- 若有菌落產生（混濁），則輕輕搖混合均勻，並以無菌吸管分別吸取菌液1.0 mL至SC及TT培養基10 mL之試管中，混合均勻；於30~35°C培養12至24小時。
- 以接種環沾取SC及TT培養基菌液，劃線接種於煌綠瓊脂培養基、亞硫酸鈹瓊脂培養基及木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基；於30~35°C培養24至48小時，觀察菌落外觀。若無典型菌落即表示此檢品符合無沙門氏菌之規定。



沙門氏桿菌檢驗方法（續）

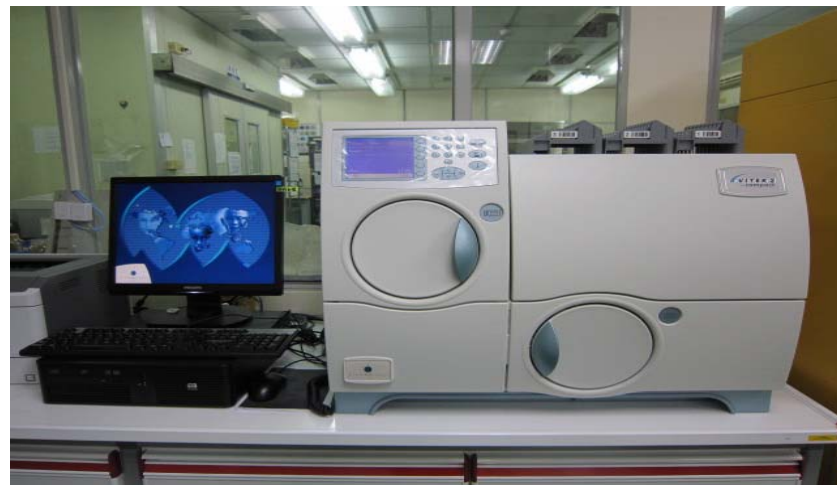
- 煌綠瓊脂培養基、木糖離胺酸去氧膽酸鹽瓊脂培養基、亞硫酸鈹瓊脂培養基，典型沙門氏桿菌菌落之性狀如下：

特殊培養基	煌綠瓊脂培養基	木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基	亞硫酸鈹瓊脂培養基	三糖鐵瓊脂培養基
菌落特徵	菌落形小、透明、無色或粉紅色至白色（常有粉紅色至紅色圈）。	呈紅色菌落，有(或無)黑色中心	菌落為綠色或黑色，有(或無)黑色中心。	斜面培養：紅色
格蘭氏染色	陰性桿菌	陰性桿菌	陰性桿菌	陰性桿菌



沙門氏桿菌檢驗方法（續）

- 若有可疑典型沙門氏菌落，則將菌落同時以穿刺及斜面劃線於三糖鐵瓊脂培養基（Triple Sugar-Iron Agar Medium）中，於35°C培養24±2小時後觀察，其結果若斜面呈紅色反應，底部呈黃色(或無色)反應，且培養基顏色不論有無變黑，皆可能是沙門氏桿菌。
- 可疑的菌落須進行多價本體(O)抗血清試驗及API 20E生化檢測套組檢測，如二者均為正反應，則判定沙門氏桿菌為陽性。使用 VITEK2 生化試驗鑑定系統





微生物檢驗室之品保

- 實驗室環境監測
- 藥品及培養基品保：培養基驗收、配製培養基之QC
- 內部人員測試
檢驗人員每年需進行盲樣測試
- 儀器設備品保
儀器設備每日登記溫度、每月保養維護1次、每3個月內部查驗1次及每年定期校正。



微生物檢驗室之品保(續)

- 測試方法：每批樣品/每項檢驗項目執行之品管監控
 - 空白樣品分析：樣品、培養基
 - 重複樣品分析
 - 陽性對照：標準菌株-為確保檢測標準菌之有效追溯，實驗室所使用之菌種皆購置「生物資源保存及研究中心 (BCRC)」