

食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗  
Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Cronobacter*

第一部：阪崎腸桿菌之分離

1. 適用範圍：本方法適用於一般食品及奶粉中阪崎腸桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌後，以選擇性增菌液及選擇性培養基培養之方法。
  - 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. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
    - 2.2.5. 天平：可稱量到 2000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
    - 2.2.6. 冰箱：能維持  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  者。
    - 2.2.7. 吸管或吸管尖：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 之刻度。
    - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
    - 2.2.9. 稀釋瓶：160 mL，玻璃、聚乙烯(polyethylene)、鐵弗龍(Teflon)或其他能耐  $121^{\circ}\text{C}$  濕熱滅菌 20 分鐘以上之塑膠材質，附螺旋蓋。
    - 2.2.10. 培養皿：已滅菌，內徑約 9 cm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。
    - 2.2.11. 增菌用容器：附螺旋蓋之 125 mL、250 mL、2 L 三角錐瓶或廣口瓶；玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐  $121^{\circ}\text{C}$  濕熱滅菌 20 分鐘以上之塑膠材質。
    - 2.2.12. pH 測定儀。
    - 2.2.13. 培養箱：能維持內部溫度溫差在  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  以內者。
    - 2.2.14. 水浴：能維持水溫溫差在  $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$  以內者。
    - 2.2.15. 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。
    - 2.2.16. 曲玻棒：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。
    - 2.2.17. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm，13 × 120 mm，15 × 150 mm，16 × 150 mm 試管，或其他適用者。

- 2.2.18. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.19. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。
- 2.2.20. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 2.2.21. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌。
- 2.2.22. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.23. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。
- 2.2.24. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑9×22 mm或其他適用者。
- 2.2.25. 試藥：氯化鈉、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、膽鹽 No. 3 (bile salts No. 3)、中性紅(neutral red)、結晶紫(crystal violet)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)、硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)、草酸銨(ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃O(safranin O)、對-二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethyl aminobenzaldehyde)、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine · 2HCl)、磷酸二氫鈉(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、葡萄糖(glucose)、牛膽鹽(ox-gall)、尿素(urea)、硝基苯吡喃半乳糖苷(*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, ONPG)、5-溴-4-氯-3-吲哚-α-D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-glucopyranoside)、檸檬酸鈉(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)、亮綠(brilliant green)、酚紅(phenol red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、磷酸二氫銨(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub>)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、肌酸(creatine)、甲基紅(methyl red)、α-萘酚(α-naphthol)、氫氧化鉀、95%乙醇(95% ethanol)、無水乙醇(absolute ethanol)、戊醇(amyl alcohol)或異戊醇(isoamyl alcohol)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、半乳糖醇(dulcitol)、核糖醇(adonitol)、棉子糖(raffinose)、山梨醇(sorbitol)、阿拉伯糖醇(D-arabitol)、氰化鉀、氫氧化鈉、L-離胺酸(L-lysine)、L-鳥胺酸(L-ornithine)、L-精胺酸(L-arginine)、礦物油(mineral oil)或液態石蠟油(paraffin oil)及鹽酸等均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptose)、酵母抽出液(yeast extract)、洋菜(agar)、胰化蛋白胨(tryptone)、大豆蛋白胨(soya peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、牛肉抽出物(beef extract)、聚蛋白胨(polypeptone)、蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder)等均採用微生物級。
- 2.2.26. 試劑：

- 2.2.26.1. 0.85%生理食鹽水：  
取氯化鈉 8.5 g 溶於 1000 mL 蒸餾水中，分裝於試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.2.26.2. 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 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。
- 2.2.26.3. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)：  
取甲基紅 0.1 g 溶於 95%乙醇 300 mL 後，再加蒸餾水使成 500 mL。
- 2.2.26.4. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer test reagents, VP reagents)：  
溶液 A：取  $\alpha$ -萘酚 5 g 溶於無水乙醇 100 mL 中。  
溶液 B：取氫氧化鉀 40 g 溶於蒸餾水中，並使成 100 mL。
- 2.2.26.5. 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 100 mL 中(氰化鉀為劇毒物質，本操作務必在抽氣櫃內進行)。
- 2.2.26.6. 礦物油或液態石蠟油：  
取礦物油或液態石蠟油 20~50 mL，裝入有蓋容器中約 1/2 滿，以 121°C 滅菌 30 分鐘。
- 2.2.26.7. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)：  
2.2.26.7.1. 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 中。  
溶液 B：取草酸銨 0.8 g 溶於蒸餾水 80 mL 中。  
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。
- 2.2.26.7.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：  
取碘化鉀 2 g 及碘 1 g 置於研钵中，經研磨 5~10 秒鐘後，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水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研钵及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成 300 mL。
- 2.2.26.7.3. 哈克氏複染液(複染劑)：  
取沙黃 O 2.5 g 溶於 95%乙醇 100 mL 中，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加蒸餾水 90 mL，作為複染液。  
註：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此若購買成品時，要注意其保存期限，若自行配製者應檢查其染色效

果。

2.2.26.8. 氧化酶試劑(Oxidase reagent)：

取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g 溶於蒸餾水 100 mL 後，貯存於褐色瓶，並置入冰箱中，使用期限以不超過 1 星期為宜。

2.2.26.9. 1M 磷酸二氫鈉溶液：

取磷酸二氫鈉 6.9 g 溶於蒸餾水 45 mL 中，徐徐注入 30% 氫氧化鈉溶液約 3 mL，調整 pH 值為 7.0，續加入蒸餾水使成 50 mL，貯存於 4°C 冰箱中備用。

2.2.26.10. 硝基苯吡喃半乳糖試劑(ONPG reagent)：

取硝基苯吡喃半乳糖 80 mg 溶於 37°C 蒸餾水 15 mL 中，再加入 1M 磷酸二氫鈉溶液 5 mL，即為 0.0133M 硝基苯吡喃半乳糖試劑，貯存於 4°C 冰箱中，使用時須加溫至 37°C。

2.2.27. 培養基：

2.2.27.1. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)

蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	3.5 g
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
蒸餾水	1000 mL

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

2.2.27.2. 加鹽硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液(Lauryl tryptose broth with 2% NaCl, 2% NaCl-LST)

胰化蛋白胨(tryptose)	20 g
乳糖(lactose)	5 g
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.75 g
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2.75 g
氯化鈉	20 g
硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)	0.1 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 10 mL 注入裝有杜蘭發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.2.27.3. 紫紅膽鹽葡萄糖培養基(Violet red bile glucose agar, VRBG)

酵母抽出液(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	7 g
氯化鈉	5 g

膽鹽 No. 3 (bile salts No. 3)	1.5 g
乳糖(lactose)	10 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.002 g
洋菜(agar)	15 g
葡萄糖(glucose)	10 g
蒸餾水	1000 mL

加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度。於 45~50°C 水浴中冷卻，最終 pH 值為 7.4±0.2。每培養皿注入約 20 mL，凝固後確定表面乾燥後使用。配製後之培養基應放置於 2~8°C 冰箱中保存，但須於一個月內使用完畢。

2.2.27.4. 阪崎腸桿菌培養基(*Enterobacter sakazakii* agar, ESA)

胰化蛋白胨(tryptone)	15 g
大豆蛋白胨(soya peptone)	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	1.0 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)	1.0 g
硫代硫酸鈉(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	1.0 g
5-溴-4-氯-3-吲哚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)	0.1 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌加熱溶解後，以 121°C，滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。冷卻至 50°C，每培養皿注入約 20 mL，凝固後確定表面乾燥後使用。

2.2.27.5. 腸內細菌科增菌培養液(*Enterobacteriaceae* enrichment broth, EE broth)

蛋白胨(peptone)	10 g
葡萄糖(glucose)	5 g
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
牛膽鹽(ox-gall)	20 g
亮綠(brilliant green)	0.015 g
蒸餾水	1000 mL

加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度，最終 pH 值為 7.2±0.2。取 90 mL 注入約 125 mL 已滅菌之附蓋三角錐瓶或廣口瓶

中，配置後之培養液應放置於 2~8°C 冰箱中保存，但須於一個月內使用完畢。

- 2.2.27.6. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)
- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| 胰化酪蛋白朊(trypticase peptone) | 15 g    |
| 植物蛋白朊(phytone peptone)     | 5.0 g   |
| 氯化鈉                        | 5.0 g   |
| 洋菜(agar)                   | 15 g    |
| 蒸餾水                        | 1000 mL |
- 平板培養基配製方法：攪拌加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。冷卻至 50°C，每培養皿注入約 20 mL，凝固後確定表面乾燥後使用；斜面培養基配製方法：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 7.3±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。
- 2.2.27.7. 尿素培養液(Urea broth)
- |  |         |
|--|---------|
| 尿素(urea)                                 | 20 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract)                     | 0.1 g   |
| 磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )  | 9.1 g   |
| 磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 9.5 g   |
| 酚紅(phenol red)                           | 0.01 g  |
| 蒸餾水                                      | 1000 mL |
- 溶解後，經濾膜過濾後，分取 1.5~3 mL 濾液，注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為 6.8±0.2。
- 2.2.27.8. 運動性試驗培養基(Motility test medium)
- |                     |         |
|---------------------|---------|
| 牛肉抽出物(beef extract) | 3 g     |
| 蛋白朊(peptone)        | 10 g    |
| 氯化鈉                 | 5 g     |
| 洋菜(agar)            | 4 g     |
| 蒸餾水                 | 1000 mL |
- 加熱溶解後，分取約 8 mL 注入附有螺旋蓋試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。
- 2.2.27.9. 氰化鉀培養液(Potassium cyanide broth)
- |  |         |
|--|---------|
| 聚蛋白朊(polypeptone)                        | 3 g     |
| 氯化鈉                                      | 5 g     |
| 磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | 0.225 g |
| 磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 5.64 g  |

- 蒸餾水.....1000 mL  
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 注入已滅菌之試管中，貯存於冰箱備用，貯存期限不得超過兩週(操作氰化鉀溶液時，需戴手套且不可用口吸取)。
- 2.2.27.10. 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)  
胰化蛋白胨(tryptone).....10 g  
蒸餾水.....1000 mL  
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。
- 2.2.27.11. MR-VP 培養液(MR-VP broth)  
蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder).....7 g  
葡萄糖(glucose) .....5 g  
磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) .....5 g  
蒸餾水.....1000 mL  
溶解後，分取約 10 mL 注入試管中，以 118~121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。
- 2.2.27.12. 溴甲酚紫培養液(Bromcresol purple broth)  
蛋白胨(peptone) .....10 g  
牛肉抽出物(beef extract) .....3 g  
氯化鈉.....5 g  
溴甲酚紫(bromcresol purple) .....0.04 g  
蒸餾水.....1000 mL  
溶解後，分取約 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，每管加入經濾膜過濾除菌之 50% (w/v) 蔗糖溶液 0.278±0.002 mL，使培養液中該糖之最終濃度為 5% (w/v)。含半乳糖醇、核糖醇、棉子糖、山梨醇及阿拉伯糖醇之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。
- 2.2.27.13. 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  
葡萄糖(glucose) .....1 g  
溴甲酚紫(bromcresol purple) .....0.02 g  
蒸餾水.....1000 mL  
加熱攪拌溶解後，取 L-離胺酸 5 g 溶解於上述之培養液中，

混合均勻，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，使成離胺酸脫羧酶培養液。含 L-精胺酸及 L-鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。對照組之配製，除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。

2.2.27.14. 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基(Simmons citrate agar)

氯化鈉.....	5 g
檸檬酸鈉(Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) .....	2 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	1 g
磷酸二氫銨(NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	1 g
硫酸鎂(MgSO <sub>4</sub> ) .....	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。

2.3. 檢液之調製與增菌培養：

2.3.1. 奶粉檢體：用振搖方式，使充分均勻混合後，以已滅菌之藥勺或其他方便使用之用具，取 100 g、10 g 及 1 g，分別加入內含預熱至 45°C 已滅菌蛋白胨緩衝液 900 mL、90 mL 及 9 mL 之 2 L、250 mL 及 125 mL 三角錐瓶中(三重複)。以上三角錐瓶得以其他耐濕熱滅菌之塑膠材質容器或玻璃試管替代，唯檢液體積以不超過容器總容量二分之一為原則。充分混合均勻，即為三階三瓶(管)之 10 倍稀釋檢液，於 35°C 培養 18~24 小時，供作檢液。因檢液於增菌培養過程可能產氣，故不可緊鎖螺旋瓶蓋(或試管蓋)，宜維持鬆動但不脫落狀態。

2.3.2. 液態食品檢體：充分均勻混合後，取 100 mL、10 mL 及 1 mL，分別加入內含 900 mL、90 mL 及 9 mL 已滅菌之蛋白胨緩衝液。充分混合均勻，即為三階三瓶(管)之 10 倍稀釋檢液，於 35°C 培養 18~24 小時，供作檢液。

2.3.3. 環境檢體或塗抹物檢體：

2.3.3.1. 環境檢體：取 1 g 置於含 2% NaCl-LST 培養液 10 mL 之試管內，於 44°C 培養 18~24 小時，供作檢液。

2.3.3.2. 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振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開。取溶出液1 mL置於含2% NaCl-LST培養液10 mL之試管內，於44°C培養18~24小時，供作檢液。或將塗抹棒之頭部置於含2% NaCl-LST培養液10 mL之試管內，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，於44°C培養18~24小時，供作檢液。

#### 2.4. 鑑別試驗：

2.4.1. 選擇性增菌培養：吸取2.3.節之檢液10 mL，加入內盛有腸內細菌科增菌培養液90 mL之160 mL稀釋瓶中。混合均勻後於35°C培養18~24小時。

#### 2.4.2. 分離培養：

2.4.2.1. 方法一：自2.4.1.節之腸內細菌科增菌培養液中取一接種環量，在VRBG及ESA培養基表面劃線後(二重複)，於35°C培養18~24小時，觀察所形成菌落之形態。阪崎腸桿菌在VRBG培養基上的典型菌落為外緣規則平整，呈淡粉紅色或紫紅色，外緣通常伴有紫紅色之膽酸(bile acids)類物質沉澱環生成；阪崎腸桿菌在ESA培養基上的典型菌落為外緣規則平整，呈綠色。自VRBG及ESA培養基上鉤取可疑菌落，劃線於TSA平板培養基，於35°C培養18~24小時後，進行下列初步生化試驗。

2.4.2.2. 方法二：自2.4.1.節之腸內細菌科增菌培養液中吸取1 mL量，加入內盛有生理食鹽水9 mL之試管中，進行系列稀釋，使增菌培養液稀釋至原來的 $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ 倍。每一管(含未稀釋之培養液)分別以無菌吸管吸取0.1 mL量，以曲玻棒均勻塗於VRBG及ESA培養基上，於35°C培養18~24小時。自VRBG及ESA培養基上鉤取可疑菌落，劃線於TSA平板培養基，於35°C培養18~24小時後，進行下列初步生化試驗。

2.4.3. 混合菌株(Mixed culture)之純化：將VRBG及ESA培養基上之未純化菌株，以四區劃法，劃於VRBG或ESA培養基，於35°C培養18~24小時後，鉤取典型菌落，劃線於TSA平板培養基，於35°C培養18~24小時後，進行下列初步生化試驗。

#### 2.5. 鑑定試驗：

##### 2.5.1. 初步生化試驗：

2.5.1.1. 氧化酶試驗(Oxidase test)：以無菌接種針挑取可疑菌株，塗抹於含有氧化酶試劑之濾紙表面。10~15秒後變為深紫色者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為氧化酶負反應。

- 2.5.1.2. 黃色色素產生試驗(Yellow pigment production test)：以無菌接種針挑取 TSA 平板培養基上可疑菌株至少 5 株，分別劃於 TSA 斜面培養基上，以 25°C 培養 48~72 小時，觀察菌株產生色素之情形。有黃色色素產生者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為正反應。
- 2.5.1.3. 尿素酶試驗(Urease test)：以無菌接種針挑取可疑菌株，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，阪崎腸桿菌為負反應。
- 2.5.1.4. 運動性試驗(Motility test)：以無菌接種針挑取可疑菌株，穿刺接種於運動性試驗培養基之表面中央點至深度 0.5 吋處。於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。當測試菌沿穿刺線呈放射線狀生長者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為正反應。
- 2.5.1.5. 革蘭氏染色(Gram stain)：以無菌接種針挑取可疑菌株，劃於 TSA 斜面培養基上，於 35°C 培養 24±2 小時，依下列步驟進行革蘭氏染色後鏡檢。
- (1) 鉤取菌體，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。
  - (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘後水洗，水洗時間應不超過 5 秒鐘。
  - (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。
  - (4) 脫色：以 95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水洗，此步驟需時甚短，僅數秒即可，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) 自然風乾。
  - (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。阪崎腸桿菌為革蘭氏陰性、無莢膜、無芽孢之桿狀菌。
- 經上述試驗，判定為可疑阪崎腸桿菌者，自 TSA 培養基鉤菌，進行下列生化試驗確認。

## 2.5.2. 生化試驗：

- 2.5.2.1. 硝基苯吡喃半乳糖苷試驗(ONPG test)：鉤菌並置於含有已滅菌之 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吡喃半乳糖苷試劑之紙錠，並輕輕搖動後，於 35°C 培養 6~24 小時，紙錠變成黃色者為

正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為正反應。

- 2.5.2.2. 氰化鉀試驗(KCN test)：鈎菌接種於氰化鉀培養液，以橡皮塞塞緊試管口，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，阪崎腸桿菌為正反應。
- 2.5.2.3. 吲哚試驗(Indole test)：鈎菌接種於胰化蛋白胨培養液中，於 35°C 培養 48±2 小時後，加入柯瓦克氏試劑 0.2~0.3 mL，輕輕搖動後靜置約 10 分鐘，上層呈紅色者為正反應，否則為負反應，大部份阪崎腸桿菌為負反應。
- 2.5.2.4. 歐普氏試驗(VP test)：鈎菌接種於 MR-VP 培養液中，於 35°C 培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一已滅菌之試管中，加入歐普氏試劑溶液 A 約 0.6 mL 及歐普氏試劑溶液 B 約 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，呈現粉紅色至鮮紅者為正反應，否則為負反應，大部份阪崎腸桿菌為正反應。
- 2.5.2.5. 甲基紅試驗(Methyl red test)：將 2.5.2.4. 節剩餘之 MR-VP 培養液於 35°C 再培養 48±2 小時後，取培養液 5 mL 至另一已滅菌試管中，加入甲基紅指示劑 5~6 滴，輕輕搖勻，呈紅色者為正反應，否則為負反應，大部份阪崎腸桿菌為負反應。
- 2.5.2.6. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鈎菌接種於辛蒙斯檸檬酸鹽斜面培養基，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，否則為負反應，阪崎腸桿菌為正反應。
- 2.5.2.7. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)：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°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，阪崎腸桿菌為精胺酸二水解酶正反應。
- 2.5.2.8. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)：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°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基呈黃色者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為負反應。

2.5.2.9. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Oornithine decarboxylase test)：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°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，阪崎腸桿菌為正反應。

2.5.2.10. 發酵試驗(Fermentation test)：鈎菌接種於分別含有蔗糖、半乳糖醇、核糖醇、棉子糖、山梨醇及阿拉伯糖醇等糖類之溴甲酚紫培養液中，於35°C培養2~5天，每隔24小時觀察其發酵情形。培養液顏色由紫色轉變為黃色，產酸者為正反應。

2.6. 判定：阪崎腸桿菌陽性者，應符合表一及表二所列之結果。

表一、 *Cronobacter*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans* 及 *E. gergoviae* 之生化反應<sup>(1)</sup>

試驗項目	<i>Cronobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
離胺酸脫羧酶 (lysine decarboxylase)	—	—	+	—	+
精胺酸二水解酶 (arginine dihydrolase)	+	+	—	—	—
鳥胺酸脫羧酶 (ornithine decarboxylase)	+	+	+	—	+
檸檬酸鹽利用 (citrate utilization)	+	+	+	[+]	+
尿素酶 (urease)	—	—	—	—	+
吲哚 (indole)	d	—	—	d	—
氰化鉀 (KCN)	+	+	+	d	—
黃色色素產生 (yellow pigment production)	+	—	—	d	—
甲基紅 (MR)	—	d	ND	ND	—
歐普氏 (VP)	+	d	ND	ND	+

(1) +表示所有菌株在1~2天內為正反應；[+]表示大部分(89%以上)在1~4天內為正反應；d表示依菌株而異(通常11~80%為正反應)；—表示所有菌株培養7天後皆為負反應；ND表示無可引用之資料。

表二、*Cronobacter*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans* 及 *E. gergoviae* 之發酵試驗<sup>(1)</sup>

試驗項目	<i>Cronobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
蔗糖 (sucrose)	+	+	+	(+)	+
半乳糖醇 (dulcitol)	(-)	(-)	-	(-)	-
核糖醇 (adonitol)	-	(-)	+	-	-
棉子糖 (raffinose)	+	+	+	V	+
山梨醇 (sorbitol)	-	+	+	V	-
阿拉伯糖醇 (D-arabitol)	-	(-)	+	-	+

(1) +表示90~100%為正反應；(+)表示75~89%為正反應；V表示25~74%為正反應；(-)表示10~24%為正反應；-表示0~9%為正反應。

2.7. 最確數計算：由 2.6. 節判定為阪崎腸桿菌陽性者之各階瓶(管)數，利用接種量為每瓶(管) 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL) 之三階三瓶(管)最確數表(如附表)，推算出阪崎腸桿菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試瓶(管)數 [每瓶(管)之接種量g 或 mL]			MPN/ mL (g)	95% 信賴界限		正反應試瓶(管)數 [每瓶(管)之接種量g 或 mL]			MPN/ mL (g)	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	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	--

說明：

經腸內細菌科增菌培養液增菌培養，劃線至 VRBG 及 ESA 培養基，並挑選可疑菌落進行鑑定試驗，確認含有阪崎腸桿菌之試瓶(管)數若為 3-3-2，對照 MPN 數為 1100，則：

- (1) 若接種量為每瓶(管)含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，則該檢體阪崎腸桿菌之最確數為 1100 (MPN/g 或 MPN/mL)。
- (2) 若接種量為每瓶(管)含檢體 100, 10, 1 (g 或 mL)，則該檢體阪崎腸桿菌之最確數應為  $1100 \div 1000 = 1.1$  (MPN/g 或 MPN/mL)。

2.8. 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。

## 第二部：阪崎腸桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於阪崎腸桿菌之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 進行鑑別之方法。
  - 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<sup>(註 1)</sup>
    - 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. 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 用<sup>(註2)</sup>

#### 2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

##### 2.3.2.1.1. 阪崎腸桿菌鑑別基因(標的基因：*MMS operon*)

引子 F：5'- GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G -3'

引子 R：5'- CGA GAA TAA GCC GCG CAT T - 3'

探針 P：

5'-(FAM)- AGA GTA GTA GTT GTA GAG GCC GTG  
CTT CCG AAA G -(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 78 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。

#### 2.3.2.2. 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：阪崎腸桿菌標準菌株或其 DNA。

### 2.4. 器具及材料<sup>(註3)</sup>

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2μL、10 μL、20 μL、100μL、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<sup>(註4)</sup>

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 $\mu$ M 探針.....	1.5 $\mu$ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 $\mu$ L
檢體 DNA 溶液.....	5.0 $\mu$ L
無菌去離子水.....	2.0 $\mu$ L
總體積.....	25.0 $\mu$ L

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 2.3.1. 節於 35°C 培養 18~24 小時之檢液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000  $\times$  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，振盪混合均勻，以 15000  $\times$  g 離心 3 分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，振盪混合均勻，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

自培養基上鈎取一接種環的菌量，置入含有 1 mL 無菌去離子水之已滅菌 1.5 mL 離心管中，振盪混合均勻，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/ $\mu$ L 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗<sup>(註 5)</sup>

### 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  $\mu$ L 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5  $\mu$ L，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. 阪崎腸桿菌菌種鑑別基因反應條件

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	15 sec
3. 黏接、延展	52°C	40 sec

步驟 2 至步驟 3，共進行 40 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。

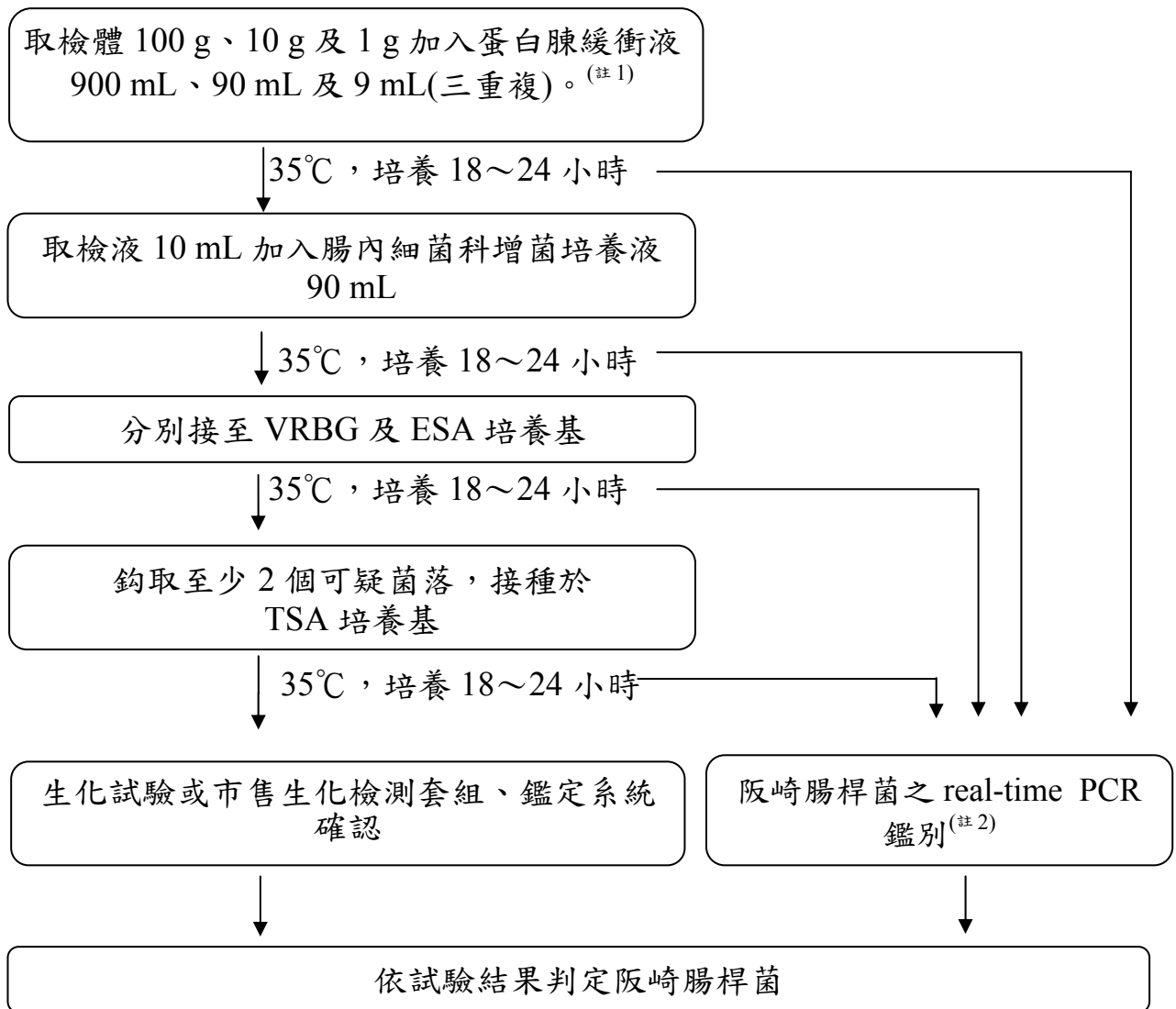
### 2.7.3. 確認

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 與阪崎腸桿菌之正反應對照組之 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 增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有阪崎腸桿菌。

註 5：本 Real-time 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：第二部阪崎腸桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

## 檢驗流程圖



註 1：為奶粉檢體時蛋白腴緩衝液需預熱至 45°C，且檢液體積不得超過容器總容量二分之一。

註 2：可依檢體含菌量情況自行探討接續之 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。