

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：阪崎腸桿菌之分離及鑑別

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：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，進行定性分析之方法。
 - 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：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
 - 2.2.4. 離心機。
 - 2.2.5. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.6. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.7. 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。
 - 2.2.8. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
 - 2.2.9. 電磁加熱攪拌器。
 - 2.2.10. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.11. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.12. 旋渦混合器。
 - 2.2.13. 吸管輔助器或微量吸管。
 - 2.2.14. 吸管：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。
 - 2.2.15. 吸管尖：已滅菌，10 μL 、20 μL 、200 μL 及1000 μL 。
 - 2.2.16. 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。

- 2.2.17. 試管：13 × 100 mm、16 × 150 mm、20 × 150 mm或其他適用者。
- 2.2.18. 離心管：已滅菌，50 mL。
- 2.2.19. 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、刮傷或其他缺點。
- 2.2.20. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑9 × 22 mm或其他適用者。
- 2.2.21. 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。
- 2.2.22. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.23. 塗抹曲棒：可滅菌，或可拋棄式者。
- 2.2.24. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。
- 2.2.25. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.26. 濾紙。
- 2.2.27. 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.28. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.29. 褐色試藥瓶。
- 2.2.30. 試藥

氯化鈉、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、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)、*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、葡萄糖(glucose)、5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、95%乙醇、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、半乳糖醇(dulcitol)、核糖醇(adonitol)、棉子糖(raffinose)、山梨糖醇(sorbitol)、 α -甲基-D-葡萄糖苷(α -methyl-D-glucoside)、阿拉伯糖醇(D-arabitol)、氰化鉀(potassium cyanide)、氫氧化鈉、L-離胺酸(L-lysine)、L-鳥胺酸(L-ornithine)、L-精胺酸(L-arginine)及礦物油(mineral oil)或液態石蠟油(paraffin oil)均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptose)、酵母抽出物(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)、膠解蛋白胨(gelysate peptone)、胨蛋白胨No.3 (proteose peptone No. 3)及酪蛋白胨蛋白酶水解物(tryptic digest of casein)均採用微生物級。

2.2.31. 試劑

2.2.31.1. 0.85%生理食鹽水(Physiological saline solution)

取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，分裝於試管，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.31.2. 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate-buffered saline, PBS)

取磷酸二氫鉀0.210 g、磷酸氫二鈉0.724 g及氯化鈉7.650 g，溶於蒸餾水500 mL，以1 N氫氧化鈉溶液調整pH值至7.4，再加蒸餾水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，冷藏備用。

2.2.31.3. 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。(氰化鉀為劇毒物質，本操作務必在抽氣櫃內進行)。

2.2.31.4. 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。

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

(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，取濾液供作初染劑。

(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解，移入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，洗液併入瓶中，加蒸餾水使成300 mL。

(3) 哈克氏複染液(複染劑)

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，作為複染原液。使用

時，取複染原液10 mL，加蒸餾水90 mL，供作複染液。

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

2.2.31.6. 氧化酶試劑(Oxidase 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，使用時新鮮配製。如貯存於褐色瓶，冷藏備用，使用期限以一週為限。

2.2.32. 培養基

2.2.32.1. 蛋白胍緩衝液(Buffered peptone water, BPW)

| | |
|---|---------|
| 蛋白胍(peptone)..... | 10 g |
| 氯化鈉..... | 5 g |
| 磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)..... | 3.5 g |
| 磷酸二氫鉀(KH_2PO_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 。

2.2.32.2. 含2%氯化鈉之硫酸月桂酸胰化蛋白胍培養液(Lauryl tryptose broth with 2% NaCl, 2% NaCl-LST)

| | |
|---|---------|
| 胰化蛋白胍(tryptose)或胰化酪蛋白胍(trypticase peptone) .. | 20 g |
| 乳糖(lactose)..... | 5 g |
| 磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)..... | 2.75 g |
| 磷酸氫二鉀(K_2HPO_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，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 6.8 ± 0.2 。

2.2.32.3. 阪崎腸桿菌培養基(DFI 配方)(*Enterobacter sakazakii* agar, ESA)(DFI formulation)

| | |
|-------------------------------------|------|
| 胰化蛋白胍(tryptone)..... | 15 g |
| 大豆蛋白胍(soya peptone)..... | 5 g |
| 氯化鈉..... | 5 g |
| 檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)..... | 1 g |

去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)..... 1 g
 硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate) 1 g
 5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside)..... 0.1 g
 洋菜(agar) 15 g
 蒸餾水..... 1000 mL

加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2。冷卻至47~50°C，分取約20 mL倒入培養皿，凝固後確定表面乾燥後使用。

2.2.32.4. 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 g
 氯化鈉..... 5 g
 洋菜(agar) 15 g
 蒸餾水..... 1000 mL

平板培養基之配製方法：加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2，冷卻至50°C，分取約20 mL倒入培養皿，凝固後確定表面乾燥後使用。斜面培養基之配製方法：加熱沸騰溶解後，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，滅菌後製成斜面長度約4~5 cm，斜面底部之深度約2~3 cm之斜面培養基。

2.2.32.5. 氰化鉀培養液(Potassium cyanide broth)

朊蛋白朊No.3 (proteose peptone No. 3)或聚蛋白朊(polypeptone)..... 3 g
 氯化鈉..... 5 g
 磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)..... 0.225 g
 磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄) 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，冷藏備用，於兩週內使用完畢(操作氰化鉀溶液時，需戴手套且不可用口吸取)。

2.2.32.6. 溴甲酚紫培養液(Bromocresol purple broth)

| | |
|-------------------------------|---------|
| 蛋白朊(peptone)..... | 10 g |
| 牛肉抽出物(beef extract)..... | 3 g |
| 氯化鈉..... | 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 注入試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.2 。冷卻後，每管加入經無菌濾膜過濾之 50% (w/v) 蔗糖溶液 0.278 ± 0.002 mL，使培養液中蔗糖之最終濃度為 5% (w/v)。含半乳糖醇、核糖醇、棉子糖、山梨糖醇、 α -甲基-D-葡萄糖苷及阿拉伯糖醇之溴甲酚紫培養液之配製亦同。

2.2.32.7. 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)

| | |
|---|---------|
| 蛋白朊(peptone)或膠解蛋白朊(gelysate peptone)..... | 5 g |
| 酵母抽出物(yeast extract)..... | 3 g |
| 葡萄糖(glucose)..... | 1 g |
| 溴甲酚紫(bromocresol purple)..... | 0.02 g |
| 蒸餾水..... | 1000 mL |

加熱溶解後，加入 L-離胺酸 5 g，溶解混勻，分取適量注入試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.5 ± 0.2 ，使成含 L-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之配製亦同。對照組之配製，除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。

2.2.32.8. 克羅諾桿菌屬呈色培養基(Chromogenic *Cronobacter* isolation agar, CCI agar)

| | |
|--|--------|
| 酪蛋白胰蛋白酶水解物(tryptic digest of casein)..... | 7 g |
| 酵母抽出物(yeast extract)..... | 3 g |
| 氯化鈉..... | 5 g |
| 檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)..... | 1 g |
| 硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)..... | 1 g |
| 去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)..... | 0.25 g |
| 5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside)..... | 0.15 g |

洋菜(agar) 15 g
蒸餾水..... 1000 mL

加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2，冷卻至47~50°C，分取約20 mL倒入培養皿，凝固後確定表面乾燥後使用。

2.3. 檢液之調製^(註2-3)與增菌培養

2.3.1. 固態食品檢體：將檢體適當粉碎混勻後，使用已滅菌之藥勺，取100 g，加入內含蛋白胍緩衝液900 mL之2 L容器中(檢液體積以不超過容器總容量二分之一為原則)，混合均勻，作為10倍稀釋檢液，於36°C培養24 ± 2小時，供作檢液。因檢液於增菌培養過程可能產氣，故不可旋緊瓶蓋，宜維持鬆動但不脫落狀態。

2.3.2. 液態食品檢體：將檢體混勻後，取100 mL，加入內含蛋白胍緩衝液900 mL之2 L容器中，混合均勻，作為10倍稀釋檢液，於36°C培養24 ± 2小時，供作檢液。

2.3.3. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管中，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加蛋白胍緩衝液5 mL，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，於44°C培養24 ± 2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之試管中，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，於44°C培養24 ± 2小時，供作檢液。

註2：處理含油脂量多、不易勻散及易起泡之檢體時，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。

註3：檢體總量不足100 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之蛋白胍緩衝液，作成10倍稀釋檢液。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 分離培養

將2.3.節之檢液混勻後，吸取40 mL注入2支已滅菌之50 mL離心管，以3000 ×g離心10分鐘，去除上清液及油脂，續將沉澱物加入PBS 200 µL (可視沉澱物量調整添加量)，旋渦混合20秒，分別吸取100 µL至ESA培養基及另一種市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基(如

Chromogenic *Cronobacter* isolation agar、R&F[®] *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) chromogenic plating medium等)，並以塗抹曲棒塗抹均勻，另亦鈎取一接種環量，在ESA培養基及市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基表面劃線(各二重複)。ESA培養基於36°C培養24±2小時，觀察所形成菌落之形態，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；市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基則依產品說明之培養條件進行培養及觀察典型菌落之形態。自ESA培養基及市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基上鈎取至少1個可疑菌落，劃線於TSA培養基，於35°C培養18~24小時，進行後續鑑定試驗。

2.4.2. 混合菌株(Mixed culture)之純化

可將ESA培養基及市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基上之未純化菌株，以四區劃法，劃線於ESA培養基或市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基，ESA培養基於36°C培養24±2小時；市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基則依產品說明之培養條件進行培養。鈎取典型菌落，劃線於TSA培養基，於35°C培養18~24小時，進行後續鑑定試驗。

2.5 鑑定試驗

2.5.1. 革蘭氏染色(Gram stain)

- (1)加適量0.85%生理食鹽水於載玻片上，以無菌接種針(或環)鈎取適量菌株，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：以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。

2.5.2. 氧化酶試驗(Oxidase test)

自TSA培養基鈎菌(避免使用鎳鉻製品)，塗抹於含有氧化酶試劑試

紙。10~15秒後變為深藍紫色者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為負反應。

2.5.3. 黃色色素產生試驗(Yellow pigment production test)

自TSA培養基鈎菌至少5株，分別劃線於TSA斜面培養基，於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。

2.5.4. 氰化鉀試驗(KCN test)

自TSA培養基鈎菌，接種於氰化鉀培養液，以橡皮塞封緊試管口，於35°C培養48 ± 2小時，每24小時觀察一次。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。

2.5.5. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)

自TSA培養基鈎菌，分別接種於含L-精胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液，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，阪崎腸桿菌為正反應。

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

自TSA培養基鈎菌，分別接種於含L-離胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液，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液呈黃色者為正反應，否則為負反應，阪崎腸桿菌為負反應。

2.5.7. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test)

自TSA培養基鈎菌，分別接種於含L-鳥胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液，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。

2.5.8. 發酵試驗(Fermentation test)

自TSA培養基鈎菌，接種於分別含有蔗糖、半乳糖醇、核糖醇、棉子糖、山梨糖醇、α-甲基-D-葡萄糖苷及阿拉伯糖醇之溴甲酚紫培養液，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，應符合下表所列之結果。

表、*Cronobacter*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans*及*E. gergoviae*之鑑定試驗

| 試驗項目 | <i>Cronobacter</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>E. agglomerans</i> | <i>E. gergoviae</i> | |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---|
| 革蘭氏染色 | 淡紅色 | 淡紅色 | 淡紅色 | 淡紅色 | 淡紅色 | |
| 氧化酶試驗 | — | — | — | — | — | |
| 黃色色素產生試驗 | + | — | — | (+) | — | |
| 氰化鉀試驗 | + | + | + | d | — | |
| 精胺酸二水解酶試驗 | + | + | — | — | — | |
| 離胺酸脫羧酶試驗 | — | — | + | — | + | |
| 鳥胺酸脫羧酶試驗 | + | + | + | — | + | |
| 發酵試驗 | 蔗糖 | + | + | + | (+) | + |
| | 半乳糖醇 | — | (—) | — | (—) | — |
| | 核糖醇 | — | (—) | + | — | — |
| | 棉子糖 | + | + | + | d | + |
| | 山梨糖醇 | — | + | + | d | — |
| | α-甲基-D-葡萄糖苷 | + | (+) | — | — | — |
| | 阿拉伯糖醇 | — | (—) | + | — | + |

「+」表示 90~100%以上為正反應，「(+)」表示 75~89%為正反應，「d」表示 25~74%為正反應，「(—)」表示 10~24%為正反應，「—」表示 0~9%為正反應。

附註：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

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：可達121°C以上者。

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：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. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。

2.2.9. 旋渦混合器。

2.2.10. 酸鹼度測定儀。

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。

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^(註1)

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：CronoF，5'-GGGATATTGTCCCCTGAAACAG-3'

引子R：CronoR，5'-CGAGAATAAGCCGCGCATT-3'

探針P：CronoP，5'-(FAM)-AGAGTAGTAGTTGTAGAG
GCCGTGCTTCCGAAAG-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小78 bp

註1：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：阪崎腸桿菌參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：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2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液^(註3)

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P..... 1.5 µL

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

檢體DNA溶液..... 5.0 µL

無菌去離子水..... 2.0 µL

總體積..... 25.0 µL

註3：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

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.節增菌液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離

心管，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，旋渦混合均勻，以15000 ×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，旋渦混合均勻，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，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，於-20°C冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自第一部2.4.節TSA培養基上鉤取一接種環分離菌株，置入內含無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管，旋渦混合均勻，煮沸10分鐘，取出離心管，待冷卻後以15000 ×g離心3分鐘，吸取上清液至另一已滅菌之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，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O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀比值作判斷，其比值宜介於1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗

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。取已滅菌之離心管，依照 2.5.節配製 real-time PCR 溶液，並注入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 200 ×g 瞬間離心後，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應^(註4)。同時另製作正反應及負反應對照組。

| 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。

註4：上述反應條件不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

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

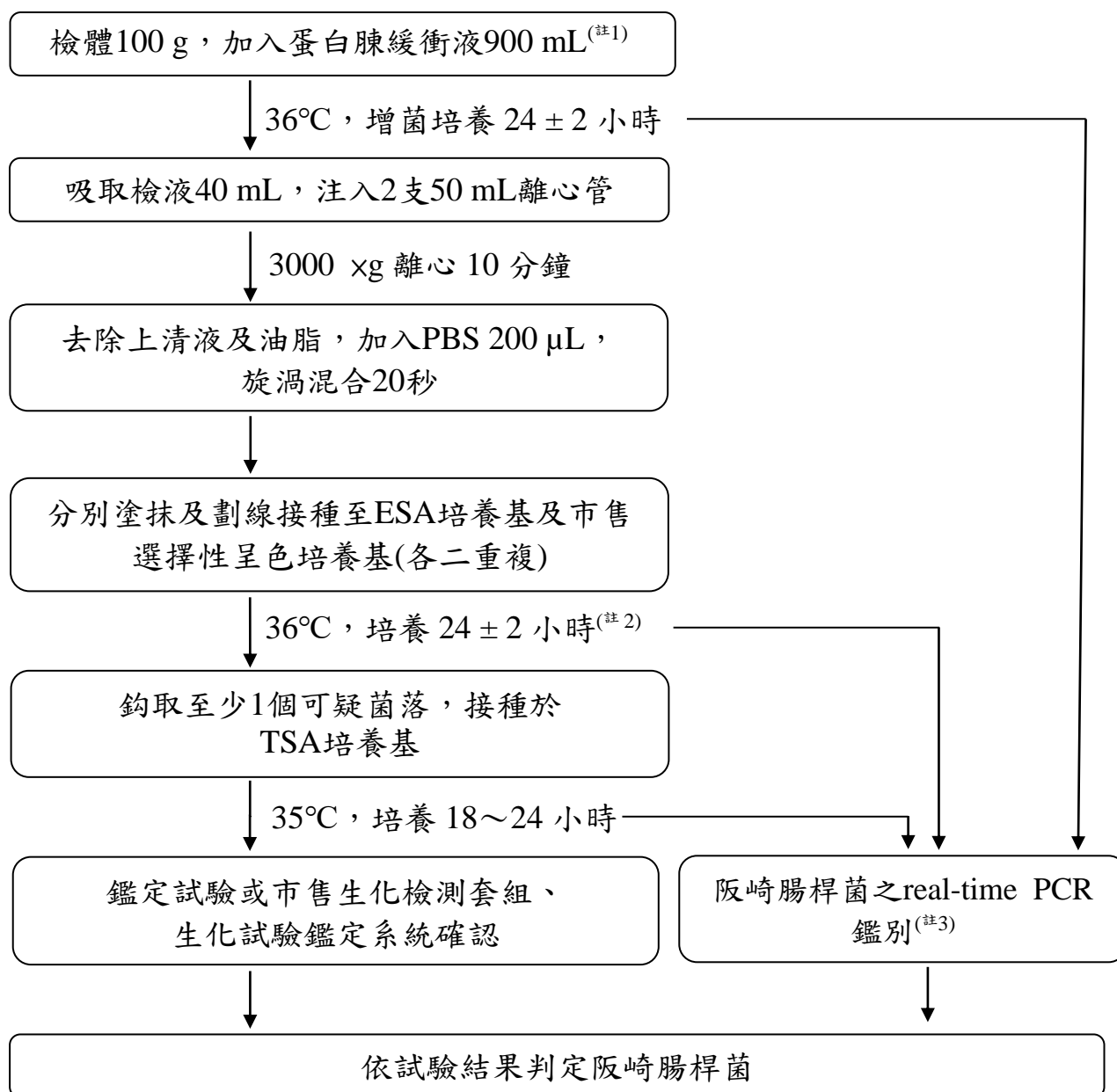
檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有阪崎腸桿菌。

附註：第二部阪崎腸桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行，其中自 TSA 培養基分離純化菌株之 real-time PCR 檢測可作為菌種生化鑑定試驗之替代方法。

參考文獻

1. Chen, Y., Miranda, N. E., Liu, K. C., Mullins, J. S., Lampel, K. and Hammack, T. 2023. Chapter 29: *Cronobacter*. Bacteriological Analytical Manual.
[<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-29-cronobacter>].
2. International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of food chain—Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.. ISO 22964.
3. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Bacteriological Analytical Manual.
[<https://wayback.archive-it.org/7993/20170406021728/https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>].

檢驗流程圖



註 1：食品檢體於增菌培養時，檢液體積以不超過容器總容量二分之一為原則。

註 2：市售阪崎腸桿菌選擇性呈色培養基則依產品說明之培養條件進行培養及觀察典型菌落之形態。

註 3：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。