

# 食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰修正「食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、第一部修正為「阪崎腸桿菌之分離及鑑別」，另修正「檢驗方法」、「器具及材料」、「試藥」、「試劑」、「培養基」、「檢液之調製與增菌培養」、「鑑別試驗」、「鑑定試驗」及「判定」，並刪除「最確數計算」。
- 二、第二部依檢驗方法格式修正「裝置」、「器具及材料」、「檢體 DNA 溶液之製備」、「鑑別試驗」及「附註」。
- 三、修正「檢驗流程圖」，另增列「參考文獻」。
- 四、增修訂部分文字。

# 食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗修正 對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>第一部：阪崎腸桿菌之分離及鑑別</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2.2. 器具及材料</p> <p>2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2. 乾熱滅菌器：<u>能維持內部溫度在170±10°C者。</u></p> <p>2.2.3. 高壓滅菌釜：<u>可達121°C以上者。</u></p> <p>2.2.4. 離心機。</p> <p>2.2.5. 冰箱：能維持5±3°C者。</p> <p>2.2.6. 培養箱：能維持內部溫度溫差在±1°C以內者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.8. 攪拌均質器或鐵胃：<u>能適用於無菌操作者。</u></p> <p>2.2.9. <u>電磁加熱攪拌器。</u></p> <p>2.2.10. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。</p> <p>2.2.11. 酸鹼度測定儀。</p> <p>2.2.12. 旋渦混合器。</p> <p>2.2.13. 吸管輔助器或微量吸管。</p> <p>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。</p> <p>2.2.15. 吸管尖：已滅菌，10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。</p>	<p>第一部：阪崎腸桿菌之分離</p> <p>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。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經增菌後，以<u>選擇性增菌液及選擇性培養基培養</u>之方法。</p> <p>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。</p> <p>2.2. 器具及材料</p> <p>2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2. 乾熱滅菌器。</p> <p>2.2.3. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.4. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.6. 冰箱：能維持5±3°C者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。</p> <p>2.2.9. 稀釋瓶：160 mL，玻璃、聚乙烯(polyethylene)、鐵弗龍(Teflon)或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之塑膠材質，附螺旋蓋。</p> <p>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。</p> <p>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</p>	<p>一、第一部修正為「阪崎腸桿菌之分離及鑑別」，另修正「檢驗方法」、「器具及材料」、「試藥」、「試劑」、「培養基」、「檢液之調製與增菌培養」、「鑑別試驗」、「鑑定試驗」及「判定」，並刪除「最確數計算」。</p> <p>二、第二部依檢驗方法格式修正「裝置」、「器具及材料」、「檢體DNA溶液之製備」、「鑑別試驗」及「附註」。</p> <p>三、修正「檢驗流程圖」，另增列「參考文獻」。</p>

<p>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<u>三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。</u></p> <p>2.2.17. 試管：<u>13 × 100 mm、16 × 150 mm、20 × 150 mm</u>或其他適用者。</p> <p>2.2.18. 離心管：<u>已滅菌，50 mL。</u></p> <p>2.2.19. 培養皿：<u>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。</u></p> <p>2.2.20. 杜蘭發酵管 (Durham fermentation tube)：<u>外徑9 × 22 mm</u>或其他適用者。</p> <p>2.2.21. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：<u>鎳鉻合金、鉑鈹或鉻線材質，或可拋棄式者。</u></p> <p>2.2.22. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：<u>可滅菌或可拋棄式者。</u></p> <p>2.2.23. <u>塗抹曲棒：可滅菌，或可拋棄式者。</u></p> <p>2.2.24. 無菌濾膜：<u>孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。</u></p> <p>2.2.25. 載玻片及蓋玻片：<u>適用於染色及鏡檢者。</u></p> <p>2.2.26. 濾紙。</p> <p>2.2.27. 蠟筆或麥克筆：<u>塗寫、劃記載玻片時使用。</u></p> <p>2.2.28. 研鉢、杵：<u>研磨試藥用。</u></p> <p>2.2.29. <u>褐色試藥瓶。</u></p> <p>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)、<u>N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)</u>、<u>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>)、</u></p>	<p>其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之<u>塑膠材質。</u></p> <p>2.2.12. <u>pH測定儀。</u></p> <p>2.2.13. 培養箱：<u>能維持內部溫度溫差在± 1°C以內者。</u></p> <p>2.2.14. 水浴：<u>能維持水溫溫差在±0.2°C以內者。</u></p> <p>2.2.15. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：<u>鎳鉻合金、鉑鈹或鉻線材質，或可拋棄式者。</u></p> <p>2.2.16. <u>曲玻棒：可滅菌者，直徑3~4 mm，塗抹區域45~55 mm。</u></p> <p>2.2.17. 試管：<u>10 × 100 mm，13 × 100 mm，13 × 120 mm，15 × 150 mm，16 × 150 mm</u>試管，或其他適用者。</p> <p>2.2.18. <u>旋渦混合器(Vortex mixer)。</u></p> <p>2.2.19. 顯微鏡：<u>能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。</u></p> <p>2.2.20. 載玻片及蓋玻片：<u>適用於染色及鏡檢用。</u></p> <p>2.2.21. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：<u>可滅菌。</u></p> <p>2.2.22. <u>濾紙及褐色試藥瓶。</u></p> <p>2.2.23. 無菌濾膜：<u>孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。</u></p> <p>2.2.24. 杜蘭發酵管 (Durham fermentation tube)：<u>外徑9 × 22 mm</u>或其他適用者。</p> <p>2.2.25. 試藥：<u>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-二甲氨基苯甲醛(<u>p-dimethyl aminobenzaldehyde</u>)、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(<u>N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl</u>)、<u>磷酸二氫鈉(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)、磷酸氫二鈉</u></u></p>	<p>四、增修訂部分文字。</p>
--	--	-------------------

磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、葡萄糖(glucose)、5-溴-4-氯-3-吲哚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -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)、 $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷( $\alpha$ -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。蛋白脛(peptone)、胰化蛋白脛(tryptose)、酵母抽出物(yeast extract)、洋菜(agar)、胰化蛋白脛(tryptone)、大豆蛋白脛(soya peptone)、胰化酪蛋白脛(trypticase peptone)、植物蛋白脛(phytone peptone)、牛肉抽出物(beef extract)、聚蛋白脛(polypeptone)、膠解蛋白脛(gelysate peptone)、脛蛋白脛No.3 (proteose peptone No. 3)及酪蛋白脛蛋白酶水解物(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

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、葡萄糖(glucose)、牛膽鹽(ox-gall)、尿素(urea)、硝基苯吡喃半乳糖苷(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG)、5-溴-4-氯-3-吲哚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)、檸檬酸鈉( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )、亮綠(brilliant green)、酚紅(phenol red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、磷酸二氫銨( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )、硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ )、溴麝香草藍(bromthymol blue)、肌酸(creatine)、甲基紅(methyl red)、 $\alpha$ -萘酚( $\alpha$ -naphthol)、氫氧化鉀、95%乙醇(95% ethanol)、無水乙醇(absolute ethanol)、戊醇(amy 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。蛋白脛(peptone)、胰化蛋白脛(tryptose)、酵母抽出液(yeast extract)、洋菜(agar)、胰化蛋白脛(tryptone)、大豆蛋白脛(soya peptone)、胰化酪蛋白脛(trypticase peptone)、植物蛋白脛(phytone peptone)、牛肉抽出物(beef extract)、聚蛋白脛(polypeptone)、蛋白脛緩衝液粉末(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)：

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)<sup>(註1)</sup>

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

蛋白胨(peptone)
--------------

10 g
------

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 置於研鉢中，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鉢及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成 300 mL。

氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3.5 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	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胨培養液(Lauryl tryptose broth with 2% NaCl, 2% NaCl-LST)

胰化蛋白胨(tryptose)或 胰化酪蛋白胨 (trypticase peptone)	20 g
乳糖(lactose)	5 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.75 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	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)

胰化蛋白胨(tryptone)	15 g
大豆蛋白胨(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- $\alpha$ -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

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

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. 1 M 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 1 M 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(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3.5 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	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(tryptone)	20 g
-----------------	------

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)

胰化酪蛋白腓 (trypticase peptone)	15 g
植物蛋白腓(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)

脲蛋白腓No.3 (proteose peptone No. 3)或聚蛋白 腓(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

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)

蛋白腓(peptone)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	3 g
氯化鈉	5 g

乳糖(lactose)	5 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.75 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	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
蛋白腓(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)

胰化蛋白腓(tryptone)	15 g
大豆蛋白腓(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-吡啶-α-D-	0.1 g

溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.04 g	吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)	
蒸餾水	1000 mL	洋菜(agar)	15 g
<p>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、<math>\alpha</math>-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。</p> <p>2.2.32.7. 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)</p>		蒸餾水	1000 mL
蛋白胨(peptone)或膠解蛋白胨(gelysate peptone)	5 g	<p>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。</p> <p>2.2.27.5. 腸內細菌科增菌培養液(<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment broth, EE broth)</p>	
酵母抽出物(yeast extract)	3 g	蛋白胨(peptone)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g	葡萄糖(glucose)	5 g
溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.02 g	磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8 g
蒸餾水	1000 mL	磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
<p>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。</p> <p>2.2.32.8. 克羅諾桿菌屬呈色培養基(Chromogenic <i>Cronobacter</i> isolation agar, CCI agar)</p>		牛膽鹽(ox-gall)	20 g
酪蛋白胰蛋白酶水解物(tryptic digest of casein)	7 g	亮綠(brilliant green)	0.015 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g	蒸餾水	1000 mL
氯化鈉	5 g	<p>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。</p> <p>2.2.27.6. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)</p>	
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	1 g	胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	1 g	植物蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)	0.25 g	氯化鈉	5.0 g
5-溴-4-氯-3-吡啶- $\alpha$ -D-	0.15 g	洋菜(agar)	15 g
		蒸餾水	1000 mL
		<p>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。</p>	



吡喃葡萄糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)	
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<sup>(註2-3)</sup>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

### 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
蛋白胍(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)

聚蛋白胍(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. 胰化蛋白胍培養液(Tryptone broth)

胰化蛋白胍(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。

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，添加適量之蛋白胨緩衝液，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

#### 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

~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)鉤取適量菌株，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培養基鉤菌(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培養基鉤菌至少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培養基鉤菌，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)

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已滅菌蛋白腴緩衝液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已滅菌之蛋白腴緩衝液。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：

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。

#### 2.5.7. 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、 $\alpha$ -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

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，添加蛋白胰緩衝液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培養基上鈎取可疑菌落，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

試驗項目	<i>Cronobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoniae</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	+	—	—	(+)	—
氯化鉀試驗	+	+	+	d	—
精胺二水解酶試驗	+	+	—	—	—
羧胺脫羧酶試驗	—	—	+	—	+
馬尿酸脫羧酶試驗	+	+	+	—	+
蔗糖	+	+	+	(+)	+
半乳糖醇	—	(—)	—	(—)	—
核糖醇	—	(—)	+	—	—
糖子糖	+	+	+	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

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 $24 \pm 2$ 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)：

<p>20000 ×g，並具4°C溫控功能。</p> <p>2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.7. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.8. <u>冷藏冷凍設備</u>：具冷藏及凍結(-20°C)功能。</p> <p>2.2.9. 旋渦混合器。</p> <p>2.2.10. 酸鹼度測定儀。</p> <p>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。</p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. Real-time PCR用<sup>(註1)</sup></p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 阪崎腸桿菌鑑別基因(標的基因：<i>MMS operon</i>)</p> <p>引子F：<u>CronoF</u>，5'-GGGATATTG TCCCCTGAAACAG-3'</p> <p>引子R：<u>CronoR</u>，5'-CGAGAATAA GCCGCGCATT-3'</p> <p>探針P：<u>CronoP</u>，5'-(FAM)-AGAG TAGTAGTTGTAGAGGCCGTGC TTCCGAAAG-(BHQ1)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小78 bp</p> <p>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。</p> <p>2.3.2.2. TaqMan<sup>®</sup> Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System)</p> <p>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。</p> <p>2.3.3. 對照用物質：阪崎腸桿菌<u>參考菌株或其DNA</u>。</p> <p>2.4. 器具及材料<sup>(註2)</sup></p>	<p><u>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。</u></p> <p>2.5.1.5. <u>革蘭氏染色(Gram stain)</u>：<u>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。</u></p> <p>(1)<u>鈎取菌體，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。</u></p> <p>(2)<u>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。</u></p> <p>(3)<u>媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘，水洗。</u></p> <p>(4)<u>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。</u></p> <p>(5)<u>複染：用哈克氏複染液複染30秒鐘，水洗。</u></p> <p>(6)<u>自然風乾。</u></p> <p>(7)<u>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。</u></p> <p><u>經上述試驗，判定為可疑阪崎腸桿菌者，自TSA培養基鈎菌，進行下列生化試驗確認。</u></p> <p>2.5.2. <u>生化試驗：</u></p> <p>2.5.2.1. <u>硝基苯吡喃半乳糖苷試驗(ONPG test)：鈎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。</u></p> <p>2.5.2.2. <u>氰化鉀試驗(KCN test)：鈎</u></p>	
---	---	--

- 2.4.1. 微量吸管：10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L及1000  $\mu$ L。
- 2.4.2. 吸管尖：可滅菌，10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L及1000  $\mu$ L。
- 2.4.3. 離心管：200  $\mu$ L、600  $\mu$ L、1.5 mL及2 mL。
- 2.4.4. Real-time PCR反應管：100  $\mu$ L。
- 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<sup>(註3)</sup>

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 $\mu$ M引子F	2.0 $\mu$ L
5 $\mu$ M引子R	2.0 $\mu$ L
5 $\mu$ M探針P	1.5 $\mu$ L
TaqMan <sup>®</sup> 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  $\times$ 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，旋渦混合均勻，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，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

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 $\pm$ 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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，呈現粉紅色至鮮紅色者為正反應，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 $\pm$ 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 $\pm$ 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，



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培養基上鈎取一接種環之分離菌株，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.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>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<sup>(註4)</sup>。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

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(Ornithine 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。



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.

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)	-	-	+	-	+
精胺二水解酶(arginine dihydrolase)	+	+	-	-	-
鳥氨酸脫羧酶(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>

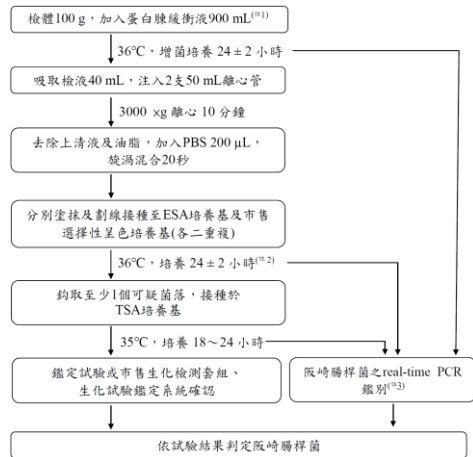
試驗項目	<i>Cronobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
蔗糖(sucrose)	±	±	±	(±)	±
半乳糖醇(dulcitol)	(-)	(-)	=	(-)	=
核糖醇(adenitol)	=	(-)	±	=	=
棉子糖(raffinose)	±	±	±	V	±
山梨糖醇(sorbitol)	=	±	±	V	=
阿拉伯糖醇(D-arabitol)	=	(-)	±	=	±

(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)。

[<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。

### 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。

	<p>Real-time PCR試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。</p> <p>2.2.裝置<sup>(註1)</sup></p> <p>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。</p> <p>2.2.2. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(classII)(含)以上者。</p> <p>2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。</p> <p>2.2.5. 微量冷凍離心機 (<u>Micro refrigerated centrifuge</u>)：可達20000×g，並具4°C溫控功能。</p> <p>2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。</p> <p>2.2.7. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。</p> <p>2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。</p> <p>2.2.9. 旋渦混合器(<u>Vortex mixer</u>)。</p> <p>2.2.10. 酸鹼度測定儀(<u>pH meter</u>)。</p> <p>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。</p> <p><u>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。</u></p> <p>2.3. 試藥</p> <p>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。</p> <p>2.3.2. Real-time PCR用<sup>(註2)</sup></p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 阪崎腸桿菌鑑別基因(標的基因：<i>MMS operon</i>)</p> <p>引子F: 5'-GGG_ATA_TTG_TCC_CT_GAA_ACA_G-3'</p> <p>引子R: 5'-CGAGAATAAGCCGCGCATT-3'</p> <p>探針P： 5'-(FAM)-AGA_GTA_GTA_GTT_GTA_GAG_GCC_GTG_CTT_CCG_AAA_G-(BHQ1)-3'</p>	
--	---	--

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 µM探針	1.5 µL
TaqMan® Fast	12.5 µL

Reagents Starter Kit	
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：為奶粉檢體時蛋白胰緩衝液需預熱至 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。