

中華民國 96 年 9 月 10 日  
行政院衛生署公告 署授食字第 0961800276 號

主 旨：公告訂定「食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗」為食品衛生管理法所定之食品衛生檢驗方法，如附件。

依 據：食品衛生管理法第二十五條。

署 長 侯勝茂

本案依分層負責規定授權局長決行

### 食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗

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：

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 乾熱滅菌器。

2.2.2 高壓滅菌釜。

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

2.2.4 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。

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

2.2.6 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。

2.2.7 吸管輔助器 (Pipette aid) 或微量分注器。

2.2.8 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。

2.2.9 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。

2.2.10 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。

2.2.11 pH 測定儀。

2.2.12 培養箱：能維持內部溫度在  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  以內者。

2.2.13 溫度計：量測溫度範圍  $1\sim 55^{\circ}\text{C}$ ，最小刻度  $0.1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.14 水浴：加蓋，具水流循環系統，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、鉑鈦或鉻線材質，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 研鉢、杵。
- 2.2.22 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌。
- 2.2.23 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.24 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.25 杜蘭發酵管（Durham fermentation tube）：外徑 9 × 22 mm 或其他適用者。
- 2.2.26 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）、硝基苯吡喃半乳糖苷（*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, ONPG）、5-溴-4-氯-3-吡啶-α-D-吡喃葡萄糖苷（5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-glucopyranoside）、亮綠（brilliant green）、酚紅（phenol red）、溴甲酚紫（bromocresol purple）、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、無水乙醇、戊醇（amyl alcohol）或異戊醇（isoamyl alcohol）、乳糖、蔗糖、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）、礦物油或液態石蠟油（paraffin oil）及鹽酸等均採用化學試藥級。
- 2.2.27 試劑：
- 2.2.27.1 無菌蒸餾水：
- 蒸餾水 900 mL、90 mL、9 mL，分裝於增菌容器或試管中，以 121℃滅菌 15 分鐘。
- 2.2.27.2 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℃滅菌 15 分鐘。
- 2.2.27.3 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℃冰箱中。

2.2.27.4 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。

2.2.27.5 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。

2.2.27.6 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)。

2.2.27.7 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。

2.2.27.8 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：

2.2.27.8.1 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。

2.2.27.8.2 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。

2.2.27.8.3 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。

2.2.27.9 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。

2.2.27.10 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。

2.2.27.11 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 0.0133 M 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℃。

2.2.28 培養基：

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

蛋白胨 (peptone)	10 g
氯化鈉 (NaCl)	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℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $7.2 \pm 0.2$ 。

2.2.28.2 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 (NaCl)	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℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $6.8 \pm 0.2$ 。

2.2.28.3 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 (NaCl)	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℃水浴中冷卻，最終 pH 值為  $7.4 \pm 0.2$ 。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℃冰箱中保存，但須於一個月內使用完畢。

2.2.28.4 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 (NaCl)	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 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	1.0 g
5-溴-4-氯-3-吲哚- $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖苷 (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℃，滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2。冷卻至 50℃，每培養皿注入約 20 mL，凝固後確定表面乾燥後使用。

2.2.28.5 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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	8 g
磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	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℃ 冰箱中保存，但須於一個月內使用完畢。

2.2.28.6 胰化酪蛋白大豆培養基 (Trypticase soy agar, TSA)

胰化酪蛋白胨 (trypticase peptone)	15.0 g
植物蛋白胨 (phytone peptone)	5.0 g
氯化鈉 (NaCl)	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℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2。冷卻至 50℃，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℃ 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。

2.2.28.7 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 ( $K_2HPO_4$ )	9.1 g
磷酸氫二鈉 ( $Na_2HPO_4$ )	9.5 g
酚紅 (phenol red)	0.01 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，經孔徑  $0.45\ \mu m$  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  $6.8 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.28.8 運動性試驗培養基 (Motility test medium)

牛肉抽出物 (beef extract)	3 g
蛋白胨 (peptone)	10 g
氯化鈉 (NaCl)	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  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $7.4 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.28.9 氰化鉀培養液 (Potassium cyanide broth)

聚蛋白胨 (polypeptone)	3 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g
磷酸二氫鉀 ( $KH_2PO_4$ )	0.225 g
磷酸氫二鈉 ( $Na_2HPO_4$ )	5.64 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $7.6 \pm 0.2$ 。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）。

#### 2.2.28.10 胰化蛋白胨培養液 (Tryptone broth)

胰化蛋白胨 (tryptone) 或胰化酪蛋白胨 (trypticase)	10 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取約 5 mL 注入試管內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.28.11 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 ( $K_2HPO_4$ )	5 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取約 10 mL 注入試管中，以  $118\sim 121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $6.9 \pm 0.2$ 。

## 2.2.28.12 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 (NaCl)	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  $7.0 \pm 0.2$ 。冷卻後，每管加入經 0.2  $\mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾除菌之 50% (w/v) 蔗糖溶液  $0.278 \pm 0.002$  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。

## 2.2.28.13 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  $6.5 \pm 0.2$ ，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。

## 2.2.28.14 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基 (Simmons citrate agar)

氯化鈉 (NaCl)	5 g
檸檬酸鈉 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	2 g
磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1 g
磷酸二氫銨 ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1 g
硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ )	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  $6.8 \pm 0.2$ 。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：

- 2.3.1 奶粉檢體（包括嬰兒配方奶粉、特殊營養配方奶粉、幼童專用奶粉及成人奶粉）：  
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 之無菌蒸餾水 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℃ 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 已滅菌之蛋白胰緩衝液。充分混合均勻，即為三階三瓶（管）之 10 倍稀釋檢液，於 35℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 培養 18~24 小時後，鉤取典型菌落，劃線於 TSA 平板培養基，於 35℃ 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℃ 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℃ 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)：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℃ 培養 24 小時後開始觀察直至  $48 \pm 2$  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℃ 培養  $24 \pm 2$  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℃ 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)：鉤菌接種於氰化鉀培養液，以橡皮塞塞緊試管口，於 35℃ 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)：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液中，於 35℃ 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)：鉤菌接種於 MR-VP 培養液中，於 35℃ 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℃ 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)：鉤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℃ 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)：鉤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℃ 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)：鉤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℃ 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)：鉤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℃ 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)：鉤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℃ 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、*E. sakazakii*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans* 及 *E. gergoviae* 之生化反應<sup>(1)</sup>

試驗項目	<i>E. sakazakii</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、*E. sakazakii*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans* 及 *E. gergoviae* 之發酵試驗<sup>(1)</sup>

試驗項目	<i>E. sakazakii</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%爲正反應；(+) 表示 75~89%爲正反應；V 表示 25~74%爲正反應；(-) 表示 10~24%爲正反應；- 表示 0~9%爲正反應。

- 2.7 最確數計算：由 2.6 節判定爲阪崎腸桿菌陽性者之各階瓶（管）數，利用接種量爲每瓶（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 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。