

食品中克羅諾桿菌屬(阪崎腸桿菌)檢驗方法之評估

吳思靜 葉民煉 黃翠萍 林澤揚 黃守潔 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

克羅諾桿菌屬(*Cronobacter*)舊稱阪崎腸桿菌(*Enterobacter sakazakii*)，為革蘭氏陰性桿菌，屬於腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)的一屬，嬰兒如食用受此菌污染的奶粉會引起腦膜炎及敗血症。有關克羅諾桿菌屬的檢驗方法，衛生福利部(下稱衛福部)已於104年公告最確數計數法，考量實驗室執行檢驗之實務需求，本研究乃參酌現行公告檢驗方法、美國FDA/BAM (Bacteriological Analytical Manual)及ISO 22964相關檢驗方法進行食品中克羅諾桿菌屬定性方法之培養基效能評估。在檢驗流程方面，考量檢體取樣量及操作方便性，採用FDA/BAM之檢驗流程；在鑑別培養基方面，則針對R&F ESPM (FDA/BAM方法)、ESA (現行公告及FDA/BAM方法)、CCI (ISO方法) 3種培養基進行靈敏度及專一性評估。結果發現以克羅諾桿菌屬51株進行測試，3者靈敏度均為100%，無偽陰性；以非目標菌44株進行測試，其中僅有1株普通變形桿菌(*Proteus vulgaris*)於R&F ESPM培養基呈現偽陽性，專一性為97.7%，而ESA及CCI培養基專一性為100%。在培養基菌數回收試驗，3種鑑別培養基的菌數回收率均大於70%，而以市售含益生菌奶粉為基質進行克羅諾桿菌屬之添加試驗結果發現，3者克羅諾桿菌屬之檢驗值均與原添加菌量相當。另以市售產品15件，進行克羅諾桿菌屬定性方法實測評估，其中有2件非屬提供6個月以下嬰兒食用之食品檢出克羅諾桿菌屬。根據本研究評估結果，擬參考FDA/BAM檢驗流程及ISO方法鑑別培養基修訂公告檢驗方法。

關鍵詞：克羅諾桿菌屬、阪崎腸桿菌、R&F培養基、ESA培養基、CCI培養基

前言

克羅諾桿菌屬(*Cronobacter*)為革蘭氏陰性菌、有鞭毛具運動性、不具莢膜、不產芽孢的兼性厭氧菌，為腸桿菌科之其中一屬⁽¹⁾。原稱為「黃色色素陰溝腸桿菌(*Yellow-pigmented Enterobacter cloacae*)」，直到1980年被更名為阪崎腸桿菌(*Enterobacter sakazakii*)⁽²⁾。2008年時，學者將*E. sakazakii*分類至*Cronobacter*。此屬由6個基因型態(*Genomospecies*)組

成：包括*C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. turicensis*、*C. muytjensii*、*C. genomospecies 1*及*C. dublinensis*^(3,4)。克羅諾桿菌屬會產生黃色色素且不耐低溫及高溫，在4°C的環境下菌體易死亡，可在5.5-46°C的溫度生長，最適生長溫度為37°C，巴斯德殺菌(Pasteurization)條件(62-65°C加熱30 min)可將其消滅⁽¹⁾，且可以在乾燥的環境中存活，因此一般建議沖泡新生兒奶粉時，應使用不低於70°C的熱水沖調嬰兒配方奶粉，以殺死奶粉中的克羅諾桿菌屬⁽⁵⁾。廣泛存

6月旦知識庫

在於環境之中，因具有吸附能力及可產生生物膜(Biofilm)的特性，因而可存活於各種食品及設備表面⁽⁶⁾，另外也經常從酸性食品中分離出克羅諾桿菌屬，顯示克羅諾桿菌屬對酸性生長條件具有相當之抗性^(7,8)。

克羅諾桿菌屬對一般人及健康嬰幼兒而言，不具致病性，但對於少數早產、低體重或免疫不全的嬰兒所引起的嚴重症狀有：腦膜炎、新生兒壞死性結腸炎、敗血症及猝死⁽¹⁾。雖然克羅諾桿菌屬的宿主尚未明瞭，但越來越多報告顯示，嬰兒配方奶粉是感染的載體⁽⁹⁾。過去最常見的中毒案例，大多發生於嬰兒飲用配方奶粉所致，因此檢驗奶粉中之克羅諾桿菌屬是必要的。根據Muytjens等人的報告指出，克羅諾桿菌屬具有 α -葡糖糖苷酶(α -Glucosidase)活性⁽¹⁰⁾，因此發展出在培養基中添加螢光或呈色原質，如4-甲基繖形酮(4-Methylumbelliferyl, 4-MU)或5-溴-4-氯-3-吡啶(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl, X)，藉此作為 α -葡糖糖苷酶的快速鑑別法⁽¹¹⁻¹⁵⁾。

克羅諾桿菌屬的檢驗方法，衛福部已於104年公告最確數(Most Probable Number, MPN)計數法⁽¹⁶⁾，為配合110年7月1日公告生效之「食品中微生物衛生標準」⁽¹⁷⁾，其中阪崎腸桿菌項目僅適用於可提供6個月以下嬰兒食用之食品，限量為陰性。本研究乃參酌FDA/BAM (Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual) Chapter 29⁽⁴⁾及ISO (International Standard for Organization) 22964:2017⁽¹⁸⁾檢驗方法(流程如圖一)進行*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) chromogenic plating medium (R&F ESPM) (FDA/BAM方法)、Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar (DFI formulation) (ESA或DFI) (現行公告及FDA/BAM方法)及Chromogenic *Cronobacter* isolation agar (CCI) (ISO方法) 3種選擇性呈色培養基之效能評估，並考量檢體取樣量及操作方便性，採用FDA/BAM之檢體量

100 g及檢驗流程進行評估及驗證。評估結果作為修訂現行公告檢驗方法之參考。

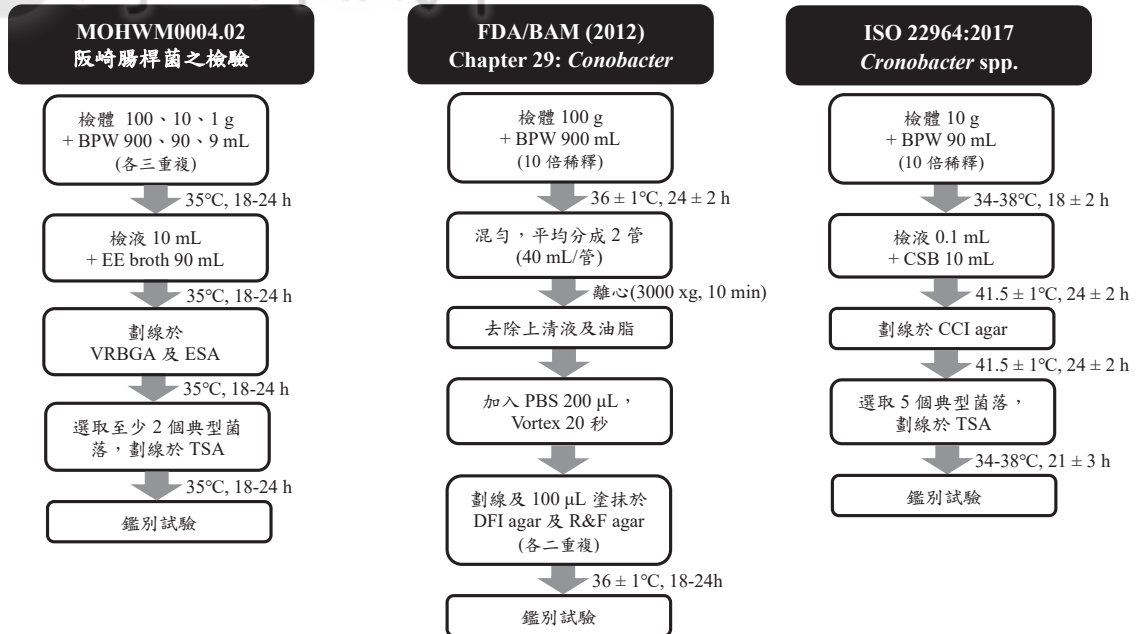
材料與方法

一、實驗菌株

實驗菌株目標菌*Cronobacter* spp. 51株，非目標菌如表一，共44株。實驗菌株購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心或抽驗市售產品之分離純化菌株。

表一、非目標菌之實驗菌株

| 非目標菌 | 菌株數量 |
|----------------------------------|------|
| <i>Aeromonas</i> spp. | 2 |
| <i>Acinetobacter pittii</i> | 1 |
| <i>Bacillus</i> spp. | 4 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 4 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 2 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 3 |
| <i>Hafnia alvei</i> | 1 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 2 |
| <i>Listeria</i> spp. | 2 |
| <i>Morganella morganii</i> | 1 |
| <i>Pantoea dispersa</i> | 1 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 1 |
| <i>Proteus</i> spp. | 2 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | 1 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 |
| <i>Raoultella orithinolytica</i> | 1 |
| <i>Salmonella</i> spp. | 2 |
| <i>Serratia</i> spp. | 2 |
| <i>Shigella</i> spp. | 3 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 2 |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 2 |
| <i>Vibrio</i> spp. | 2 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 |



圖一、克羅諾桿菌屬(阪崎腸桿菌)之檢驗流程

二、靈敏度 (Sensitivity) 及 專一性 (Specificity) 試驗

目標菌及非目標菌進行靈敏度及專一性試驗。試驗流程：鉤取BHI (Brain Heart Infusion Broth)增菌培養液10 μL，分別劃線於3種鑑別培養基(R&F ESPM、ESA、CCI)，分別於36°C及41.5°C倒置培養18-24小時，觀察菌落型態(R&F ESPM：藍黑或藍灰色；ESA：藍綠色；CCI：藍綠色)，以判定試驗菌株是否有偽陰性及偽陽性。

三、培養基菌數回收率(Product Recovery, P_R)試驗

BHI增菌培養液1 mL，磷酸鹽緩衝液(Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water, BPBW) 9 mL，依序製備10、100、1,000倍等系列稀釋檢液。吸取各稀釋檢液1 mL並注入培養皿，分別倒入3種鑑別培養基及TSA培養基(對照組)，混合均勻並待培養基凝固後，倒

置培養18-24小時(R&F ESPM、ESA、TSA：36°C，CCI：41.5°C)，計數典型菌落菌數，並計算菌數回收率(Product Recovery, P_R)。

$$\text{菌數回收數}(\%) = \frac{\text{鑑別培養基菌數}}{\text{TSA培養基菌數}} \times 100$$

四、市售產品實測評估

本研究價購嬰幼兒較常用之市售產品共15件，以FDA/BAM檢驗流程及3種鑑別培養基行檢驗。檢驗流程如下：固態檢體以均質機攪拌均勻，稱取檢體100 g，加入蛋白胨緩衝液(Buffered Peptone Water, BPW) 900 mL，混合均勻，於36 ± 1°C培養24 ± 2小時，進行預增殖。吸取檢液40 mL，共2管(共80 mL)，分別置入50 mL離心管，以3,000 xg離心10分鐘，去除上清液，以無菌棉棒清除離心壁上之油脂，加入磷酸鹽緩衝液(Phosphate Buffered Saline, PBS) 200 μL回溶底部沉澱物，混合均勻。取檢液100 μL及一接種環菌量(10 μL)至R&F

月旦知識庫

ESPM、ESA及CCI培養基進行塗抹及劃線培養(二重複)，R&F ESPM及ESA培養基於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 倒置培養18-24 h，CCI培養基於 $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ 倒置培養 24 ± 2 小時，觀察所形成菌落之生長狀態。克羅諾桿菌屬於R&F ESPM培養基呈藍黑色或藍灰色菌落，如有其他非目標菌生長使培養基背景顏色由紅色轉為黃色，則呈藍色至綠色；於ESA及CCI培養基呈藍綠色菌落。

結果與討論

衛福部依食品安全衛生管理法第十七條訂定食品中微生物衛生標準，其中阪崎腸桿菌項目僅適用於可提供6個月以下嬰兒食用之食品，限量為陰性，另依同法第三十八條訂定相對應之公告檢驗方法。目前公告方法係以MPN最確數計數法進行檢驗，考量實驗室執行檢驗之實務需求，本研究參考FDA/BAM及ISO 22964相關檢驗方法進行定性檢驗方法之評估。

一、檢驗流程評估

本研究以FDA/BAM方法作為主要檢驗流程之評估及驗證，並同時評估FDA/BAM及ISO方法所使用之鑑別培養基(R&F ESPM、ESA及CCI)，皆是透過檢測克羅諾桿菌屬產生 α -葡萄糖苷酶之特性，該酵素可將培養基內含呈色原質5-溴-4-氯-3-吲哚- α -D-吡喃葡萄糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside, X- α -Glc)水解產生呈色物質(X)，以觀察鑑別培養基上生長的典型菌落型態。

二、鑑別培養基靈敏度及專一性試驗

為評估克羅諾桿菌屬檢驗方法之偽陰性及偽陽性，以R&F ESPM、ESA及CCI培養基進行靈敏度及專一性試驗。

靈敏度試驗：以目標菌共51株，劃線於

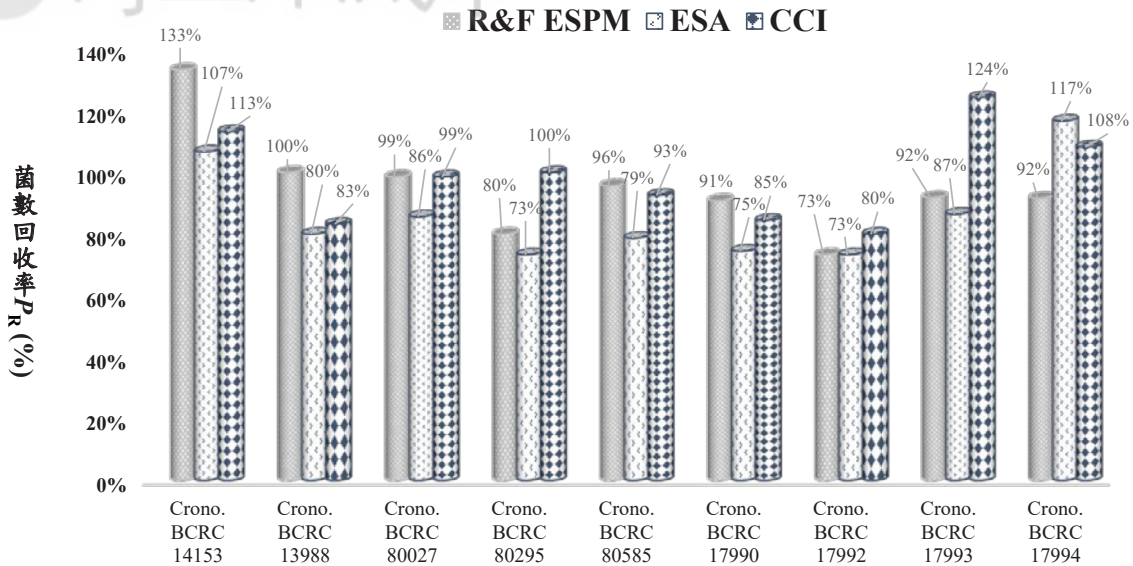
R&F ESPM、ESA及CCI培養基進行檢測。結果顯示：克羅諾桿菌屬於3種培養基皆無偽陰性，靈敏度結果為100%。

專一性試驗：以非目標菌共44株，劃線於R&F ESPM、ESA及CCI培養基進行檢測。結果顯示：僅有*Proteus vulgaris*於R&F ESPM培養基呈偽陽性。文獻指出，*P. vulgaris*也會產生 α -葡萄糖苷酶，可以生長與克羅諾桿菌屬顏色相似的菌落⁽¹⁹⁾，但*Proteus spp.*在ESA及CCI培養基上，由於硫化亞鐵的鐵離子存在下，會產生硫化氫，形成灰色菌落，典型克羅諾桿菌屬於ESA及CCI培養基上會呈現藍綠色，故予以區別，惟*Proteus spp.*之灰色菌落於R&F ESPM培養基上，與典型克羅諾桿菌屬顏色相似，皆為藍灰色，易誤判呈偽陽性，但可以藉由進一步試驗(如Vitek 2、Rapid ID 32E或MALDI-TOF)來確認及排除。

由前述結果得知，ESA及CCI培養基檢測克羅諾桿菌屬之專一性達100%；R&F ESPM培養基之專一性為97.7%。

三、培養基菌數回收率之探討

為評估R&F ESPM、ESA及CCI培養基之效能，以克羅諾桿菌屬9株(BCRC 14153、BCRC 13988、BCRC 80027、BCRC 80295、BCRC 80585、BCRC 17990、BCRC 17992、BCRC 17993、BCRC 17994)，進行培養基菌數回收率試驗。結果顯示於圖二，R&F ESPM、ESA及CCI培養基菌數回收率：BCRC 14153為133%、107%及113%；BCRC 13988為100%、80%及83%；BCRC 80027為99%、86%及99%；BCRC 80295為80%、73%及100%；BCRC 80585為96%、79%及93%；BCRC 17990為91%、75%及85%；BCRC 17992為73%、73%及80%；BCRC 17993為92%、87%及124%；BCRC 17994為92%、117%及108%。3種鑑別培養基菌數回收率均大於70%，符合培養基之性能標準⁽²⁰⁾。



圖二、鑑別培養基之菌數回收率(Product recovery, P_R)試驗

四、基質添加及混菌試驗之回收率探討

為了解非目標菌(雜菌)及基質對於檢測克羅諾桿菌屬之影響，分別以無菌之TSB培養液及市售含益生菌之奶粉為基質，進行添加試驗。本試驗共設計二組試驗，且個別皆有實驗組與對照組，以評估添加非目標菌及基質對於鑑別培養基檢驗效能之影響。

第一組以TSB培養液為基質進行試驗，混菌添加試驗以目標菌及不同非目標菌預估約以1:100比例之菌量進行添加。A組-克羅諾桿菌屬(*Cronobacter* sp.)菌數為 1.6×10^2 CFU/mL，B組-產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)菌數為 2.0×10^4 CFU/mL，C組-產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*)菌數為 3.0×10^4 CFU/mL，D組-克羅諾桿菌屬(*Cronobacter* sp.)及產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)菌數為 1.6×10^2 CFU/mL及 2.0×10^4 CFU/mL，E組-克羅諾桿菌(*Cronobacter* sp.)及產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*)菌數為 1.6×10^2 CFU/mL及 3.0×10^4 CFU/mL，F組-克羅諾桿菌屬(*Cronobacter* sp.)及非目標菌(*Klebsiella oxytoca*)

及*Enterobacter aerogenes*)菌數為 1.6×10^2 CFU/mL及 5.0×10^4 CFU/mL添加至TSB培養液，使用R&F ESPM、ESA及CCI培養基以平板計數法檢測克羅諾桿菌之菌數。結果如下：A組皆為 1.5×10^2 CFU/mL，菌數回收率為93.8%，B組及C組於3種鑑別培養基皆未檢出克羅諾桿菌屬，D組為 1.6×10^2 CFU/mL、 1.4×10^2 CFU/mL及 1.5×10^2 CFU/mL，菌數回收率為100%、87.5%及93.8%，E組為 1.6×10^2 CFU/mL、 1.2×10^2 CFU/mL及 1.6×10^2 CFU/mL，菌數回收率為100%、75%及100%，F組為 1.2×10^2 CFU/mL、 1.2×10^2 CFU/mL及 1.4×10^2 CFU/mL，菌數回收率為75%、75%及87.5% (表二)。結果顯示，無論高菌量單株或高菌量多株非目標菌與低菌量目標菌之混菌試驗，目標菌於3種鑑別培養基檢出之菌數相當，且回收率皆可達75%以上。顯示當目標菌與非目標菌約以1:100比例之菌量添加於基質時，皆不影響目標菌於3種鑑別培養基之檢出，且檢驗效能皆良好。

第二組以市售含益生菌奶粉為食品基質，

表二、TSB培養液添加及混菌之試驗結果

| Treatment | Crono. bacteria added (CFU/mL) | Non-Crono. bacteria added (CFU/mL) | Number of bacteria detected (CFU/mL) | | | | | | | |
|--|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | TSA | | R&F ESPM | | ESA | | CCI | |
| | | | Total | Typical | Total | Typical | Total | Typical | Total | Typical |
| Crono. | 1.6×10^2 | NA | 1.6×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 |
| <i>K. oxytoca</i> | NA | 2.0×10^4 | 2.1×10^4 | 2.0×10^4 | ND | 1.6×10^4 | ND | 1.5×10^4 | ND | ND |
| <i>E. aerogenes</i> | NA | 3.0×10^4 | 2.9×10^4 | 3.1×10^4 | ND | 2.8×10^4 | ND | 2.6×10^4 | ND | ND |
| Crono. + <i>K. oxytoca</i> | 1.6×10^2 | 2.0×10^4 | 1.8×10^4 | 2.1×10^4 | 1.6×10^2 | 1.6×10^4 | 1.4×10^2 | 2.1×10^4 | 1.5×10^2 | 1.5×10^2 |
| Crono. + <i>E. aerogenes</i> | 1.6×10^2 | 3.0×10^4 | 2.5×10^4 | 2.9×10^2 | 1.6×10^2 | 2.5×10^4 | 1.2×10^2 | 2.3×10^4 | 1.6×10^2 | 1.6×10^2 |
| Crono. + <i>K. oxytoca</i> + <i>E. aerogenes</i> | 1.6×10^2 | 5.0×10^4 | 4.5×10^4 | 4.9×10^4 | 1.2×10^2 | 4.7×10^4 | 1.2×10^2 | 4.8×10^4 | 1.4×10^2 | 1.4×10^2 |
| Blank | NA | NA | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

^a Inoculation strains: *Cronobacter* sp.; *Klebsiella oxytoca*; *Enterobacter aerogenes*; ^b Culture media: Tryptone soy agar (TSA); R&F *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium (R&F ESPM); Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar (ESA); Chromogenic *Cronobacter* isolation agar (CCI); ^c NA: No added; ^d ND: not detected (< 1 CFU/mL); ^e Total = colonies of *Cronobacter* sp. (Typical) and non-*Cronobacter*.

由於嬰幼兒奶粉經常會添加高菌量之益生菌，為了解益生菌的存在是否會影響克羅諾桿菌屬之檢出，設計添加不同菌量之克羅諾桿菌屬，以確認其檢測極限。另以食品基質作為對照組，先加入BPW並混合均勻，經序列稀釋後以TSA培養基及3種鑑別培養基培養及計數，以確認其菌數及是否含克羅諾桿菌屬，再進一步進行添加試驗。對照組檢測結果：菌數為 1.2×10^7 CFU/mL，且未檢出克羅諾桿菌屬。實驗組加入BPW並混合均勻後，進行添加試驗。A組添加8 CFU/mL，B組添加 8.0×10^1 CFU/mL，C組添加 8.0×10^2 CFU/mL，使用於3種鑑別培養基以平板計數法檢測克羅諾桿菌屬，菌數如下：A組為8 CFU/mL、7 CFU/mL及9 CFU/mL，菌數回收率為100%、87.5%及112.5%，B組為 7.3×10^1 CFU/mL、 7.4×10^1 CFU/mL及 7.7×10^1 CFU/mL，菌數回收率為91.3%、92.5及96.3%，C組為 7.4×10^2 CFU/mL、 7.2×10^2 CFU/mL及 8.0×10^2 CFU/mL，菌數回收率為92.5%、90%及100% (表三)。結果顯示，以含有高達 10^7 CFU/mL益生菌之市售奶粉為基質，無論添加低或高菌量之克羅諾桿菌屬，3種鑑別培養基皆可以不受基質之非目標菌影響而檢測出目標菌，並且皆可正確檢測目標菌之菌量。

五、市售產品之克羅諾桿菌屬檢驗方法適用性探討

價購嬰幼兒較常食用之市售產品共15件(副食品9件、奶粉3件、鮮奶1件、肉類1件及綜合果汁1件)進行檢驗。結果如表四所示，共有產品3件(點心泥、綜合果汁及豬絞肉)於R&F ESPM培養基發現可疑菌落；惟僅有2件產品(點心泥、綜合果汁)於ESA及CCI培養基發現可疑菌落。進一步將可疑菌落以CCI培養基分離純化後接種至TSA培養基，以Vitek 2、Rapid ID 32E、MALDI-TOF及Real-time PCR進行菌種鑑定。點心泥、綜合果汁於3種鑑別培



表三、食品基質(含益生菌奶粉)添加及混菌之試驗結果

| Treatment | Crono. bacteria added (CFU/mL) | Number of Bacteria Detected (CFU/mL) | | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | TSA | R&F ESPM | | ESA | | CCI | |
| | | | Total | Typical | Total | Typical | Total | Typical |
| Probiotic Milk Powder (PMP) | NA | 1.2×10^7 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Experiment A (Crono. + PMP) | 8 | 1.0×10^7 | 8 | 8 | 7 | 7 | 9 | 9 |
| Experiment B (Crono. + PMP) | 8.0×10^1 | 1.2×10^7 | 7.3×10^1 | 7.3×10^1 | 7.4×10^1 | 7.4×10^1 | 7.7×10^1 | 7.7×10^1 |
| Experiment C (Crono. + PMP) | 8.0×10^2 | 1.4×10^7 | 7.4×10^2 | 7.4×10^2 | 7.2×10^2 | 7.2×10^2 | 8.0×10^2 | 8.0×10^2 |

^a Culture media: Tryptone soy agar (TSA); R&F *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium (R&F ESPM); Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar (ESA); Chromogenic *Cronobacter* isolation agar (CCI); ^bNA: No added; ^cND: not detected (< 1 CFU/mL); ^dTotal = colonies of *Cronobacter* sp. (Typical) and non-*Cronobacter*.

表四、市售產品於鑑別培養基之試驗結果

| Sample | TSA | R&F ESPM | | ESA | | CCI | |
|------------|-----|----------|------------------|----------|---------|----------|---------|
| | | Atypical | Typical | Atypical | Typical | Atypical | Typical |
| 低脂鮮奶 | - | - | - | - | - | - | - |
| 幼兒成長配方奶粉 | + | - | - | - | - | - | - |
| 成長奶粉(含益生菌) | + | - | - | - | - | - | - |
| 全穀麥精 | + | + | - | + | - | + | - |
| 蘋果水蜜桃泥 | - | - | - | - | - | - | - |
| 洋梨纖果泥 | + | - | - | - | - | - | - |
| 點心泥 | + | + | + | + | + | + | + |
| 燒菓子 | + | - | - | - | - | - | - |
| 奶粉(含麥粉) | + | + | - | + | - | + | - |
| 綜合果汁 | + | + | + | + | + | + | + |
| 蔬菜雞肝粥 | + | - | - | - | - | - | - |
| 米餅 | + | + | - | + | - | + | - |
| 豬絞肉 | + | + | + | + | - | + | - |
| | | | (false positive) | | | | |
| 豬纖菜粥 | + | + | - | + | - | + | - |
| 嬰兒牛奶餅 | + | - | - | - | - | - | - |

^a Culture media: Tryptone soy agar (TSA); R&F *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium (R&F ESPM); Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar (ESA); Chromogenic *Cronobacter* isolation agar (CCI); ^b-: No Growth; +: Growth; ^cAtypical: Non-*Cronobacter*; Typical: *Cronobacter*; ^dfalse positive: *Proteus vulgaris*.

6月旦知識庫

養基生長之可疑菌落，4種方法鑑別結果皆為克羅諾桿菌屬；惟豬絞肉於R&F ESPM培養基生長之可疑菌落，經鑑別結果為*P. vulgaris*而非克羅諾桿菌屬，該偽陽性菌株與前述專一性試驗之結果一致。本研究結果，有2件非屬提供6個月以下嬰兒食用之食品(點心泥、綜合果汁)檢出克羅諾桿菌屬，且3種鑑別培養基結果一致。

結 論

本研究結果顯示，以FDA/BAM Chapter 29及ISO 22964之鑑別培養基同時檢測克羅諾桿菌屬，兩種檢驗方法所使用之3種鑑別培養基(R&F ESPM、ESA及CCI)於靈敏度試驗(偽陰性)、專一性試驗(偽陽性)、培養基菌數回收率試驗、基質添加及混菌試驗、市售產品實測評估，檢測結果皆相當且符合檢驗要求，惟R&F ESPM培養基之準確率較ESA及CCI培養基略低，但可疑菌落皆可於後續菌種鑑定予以排除。考量實驗室執行檢驗之實務需求，本研究評估結果擬參考FDA/BAM檢驗流程及ISO方法鑑別培養基修訂公告檢驗方法。

參考文獻

1. 行政院衛生署食品藥物管理局。2009。認識阪崎腸桿菌。行政院衛生署藥物食品安全週報第179期。
2. Farmer Iii, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., Brenner, D. J. and *et al.* 1980. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 30(3): 569-584.
3. Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D. and *et al.* 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(6): 1442-1447.
4. Chen, Y., Lampel, K., and Hammack, T. 2012. Chapter 29: *Cronobacter*. *Bacteriological Analytical Manual*. [<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-29-cronobacter>].
5. 世界衛生組織(WHO)與聯合國糧食及農業組織(FAO)。2007。安全製備、貯存和嬰兒配方奶粉指導原則。 [https://web.archive.org/web/20151203125211/http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines_ch.pdf].
6. Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C. and *et al.* 2010. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(4): 339-350.
7. Jaradat, Z. W., Al Mousa, W., Elbetieha, A., Al Nabulsi, A. and *et al.* 2014. *Cronobacter* spp.—opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J. Med. Microbiol.* 63(8): 1023-1037.
8. Ueda, S. 2017. Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. *Biocontrol Sci.* 22(1): 55-59.
9. World Health Organization. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. World Health Organization.

10. Muytjens, H. L., Van der Ros-van de Repe, J. and van Druten, H. A. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J. Clin. Microbiol.* 20(4): 684-686.
11. Guillaume-Gentil, O., Sonnard, V., Kandhai, M. C., Marugg, J. D. and *et al.* 2005. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Protect.* 68(1): 64-69.
12. Iversen, C., Druggan, P. and Forsythe, S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 96(2): 133-139.
13. Leuschner, R. G. K. and Bew, J. 2004. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 87(3): 604-613.
14. Oh, S. W. and Kang, D. H. 2004. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9): 5692-5694.
15. Song, K. Y., Seo, K. H., Thammasuvimol, G. and Brackett, R. 2005. Development of selective media for detection of *Enterobacter sakazakii* by using ferrioxamine E and alpha-glucosidase substrates. The 11th Annual FDA Science Forum, pp. 27-28. US FDA Press, USA.
16. 衛生福利部。2015。食品微生物之檢驗方法－阪崎腸桿菌之檢驗(MOHWM 0004.02)。104年1月7日部授食字第1031902012號公告修正。
17. 衛生福利部。2020。食品中微生物衛生標準。109年10月6日衛授食字第1091302247號公告訂定。
18. International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.. ISO 22964.
19. Iversen, C., Druggan, P. and Forsythe, S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 96(2): 133-139.
20. International Organization for Standardization. 2014. Microbiology of food chain – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. ISO 11133.



Evaluation of Test Methods for Detection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in Foods

SZU-CHING WU, MIN-LIEN YEH, TSUI-PING HUANG, CHE-YANG LIN,
SHOU-CHIEH HUANG, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Cronobacter, formerly known as *Enterobacter sakazakii*, is a genus of Gram-negative bacteria of the family Enterobacteriaceae. Powdered infant formula (PIF) contaminated with *Cronobacter sakazakii* has been confirmed to be related with neonatal meningitis and septicemia. In Taiwan, Ministry of Health and Welfare (MOHW) has promulgated a method of the most probable number (MPN) to estimate *Cronobacter* in foods in 2015. In response to the needs of laboratory inspection, a qualitative method to test the presence of *Cronobacter* in the food is required. Therefore, this study aimed to evaluate the performance of several media used in qualitative methods for detecting *Cronobacter* established by the MOHW, US Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual (FDA/BAM) and International Standard for Organization (ISO) 22964. Considering the sample size and the convenience of operation, the inspection processes of FDA/BAM were adopted. Three commercial chromogenic media were compared for the sensitivity and specificity in detecting *Cronobacter*: R&F *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium (R&F ESPM) (method of FDA/BAM), Brilliance *Enterobacter sakazakii* Agar (ESA) (method of MOHW and FDA/BAM), and Chromogenic *Cronobacter* isolation agar (CCI) (method of ISO). The sensitivity was 100% for all types of chromogenic plates in detecting 51 strains of *Cronobacter*. Only 1 strain of *Proteus vulgaris* was shown false positive in R&F ESPM, so that the specificity was 97.7% for R&F ESPM and 100% for ESA and CCI, as evaluated with 44 non-targeted bacteria. The recovery rates were higher than 70% for all types of chromogenic plates. The effect of food matrix was evaluated by spiking probiotic milk powder with *Cronobacter* and the final colony counts out of three commercial chromogenic media were comparable to the numbers of spiked bacteria. Finally, 15 food products were tested, and *Cronobacter* was detected in two products which were not food sold exclusively for infants less than 6 months of age. Based on the results of this study, the official test method will be revised toward the use of FDA/BAM method and ISO method chromogenic media.

Key words: *Cronobacter*, *Enterobacter sakazakii*, R&F, ESA, CCI