

阪崎腸桿菌之檢驗

王叔苑、王肇馨、王貞懿

阪崎腸桿菌 (*Enterobacter sakazakii*) 為腸內細菌科 (*Enterobacteriaceae*)，菌體長約 1 ~ 3 μm ，寬約 1 μm ，為革蘭氏陰性、兼性厭氧、不產芽孢、不具莢膜、且有 6 ~ 8 條鞭毛具運動性之桿狀細菌。其一般性質與其它腸內菌科細菌相似，特別之處為會產生黃色色素且不耐低溫，置於 4°C 下菌體易死亡。可生長溫度約為 5.5 ~ 46°C，最適生長溫度為 37°C，可被一般巴斯德殺菌 (pasteurization) 條件所殺滅。阪崎腸桿菌早期被歸類為會產生黃色色素的下水道腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*)，後來研究發現兩者在 DNA 親源關係、黃色色素產生及生化反應等多種特性上有所差異，因此在 1980 年被獨立出來。阪崎腸桿菌廣泛存在於周遭環境中，因為具有吸附能力及產生生物膜 (biofilm) 等特性，因此可存活於各種食品及設備中，且不易被一般的清潔操作所清除，因此，奶粉、穀類及麵糰類製品等加工廠之設備，或是醫院、家庭用來沖泡奶粉及清洗奶瓶等器具中都曾被檢出，顯示阪崎腸桿菌經常藉由這些途徑污染食品。由於阪崎腸桿菌常存於環境中，食品或物體表面若接觸到阪崎腸桿菌則容易因其特性而存活下來，當生長條件適合時則就可能大量增殖，而增加感染的風險。

阪崎腸桿菌因為具有吸附性並且會產生生物膜，因此可提高對環境壓力的耐受性，得以在奶粉及乾燥環境中存活，為奶粉中的主要風險菌之一，其造成食因性中毒主要發生於 1 歲以下嬰兒，尤其是早產兒及新生兒，且通常引起嚴重症狀，如：腦膜炎 (meningitis)、新生兒壞死性結腸炎 (neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)、敗血症及猝死。而腦膜炎存活下來者通常會有嚴重的後遺症，如：腦水腫、四肢麻痺及神經發展遲緩等。有愈來愈多的報告指出這些感染的個案與食用嬰兒配方奶粉有關。嬰兒配方奶粉中若存在有微量的阪崎腸桿菌，一經沖泡後若未立即食用，則可能大量增殖而造成嬰兒感染的風險。目前 WHO 建議將嬰兒配方奶粉標示為非無菌 (non-sterile)，藉此來提醒大眾，嬰兒配方奶粉中可能存在有害的細

菌，如：阪崎腸桿菌。除來自奶粉的風險之外，沖泡奶粉時人員的操作及器具等也是可能的污染源之一，因此，本篇特針對奶粉、一般食品及環境檢體檢驗阪崎腸桿菌時之工作環境及材料要求，以及檢驗程序等詳述於下，即時提供各界參考。

一、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。

二、器具及材料：

1. 乾熱滅菌器。
2. 高壓滅菌釜。
3. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
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。
5. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
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。
7. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
8. 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。
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。
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°C 濕熱滅菌 20 分鐘以上之塑膠材質。
11. pH 測定儀。
12. 培養箱：能維持內部溫度在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
13. 溫度計：量測溫度範圍 $1 \sim 55^{\circ}\text{C}$ ，最小刻度 0.1°C 。
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。
15. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鍍鉻合金、鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。

16. 曲玻棒：可滅菌者，直徑 3 ~ 4 mm，塗抹區域 45 ~ 55 mm。
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。
18. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
19. 顯微鏡：能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡。
20. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
21. 研鉢、杵。
22. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌。
23. 濾紙及褐色試藥瓶。
24. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。
25. 杜蘭發酵管 (Durham fermentation tube)：外徑 9 × 22 mm 或其他適用者。
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-二甲氨基苯甲醛 (*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 (NaH₂PO₄ • H₂O)、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)、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。
27. 試劑：

- (1) 無菌蒸餾水。
- (2) 0.85%之無菌生理食鹽水。
- (3) 柯瓦克氏試劑 (Kovacs' reagent)：須保存於 4°C 冰箱中。
- (4) 甲基紅指示劑 (Methyl red indicator)。
- (5) 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer test reagents, VP reagents)。
- (6) 0.5%氰化鉀溶液 (0.5% potassium cyanide solution)：氰化鉀為劇毒物質，配製操作務必在抽氣櫃內進行。
- (7) 礦物油或液態石蠟油：以 121°C 滅菌 30 分鐘。
- (8) 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)：包括哈克氏 (Hucker's) 結晶紫液 (初染劑)、革蘭氏碘液 (媒染劑) 及哈克氏複染液 (複染劑)。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。
- (9) 氧化酶試劑 (Oxidase reagent)：配製後貯存於褐色瓶，並置入冰箱中，使用期限以不超過 1 星期為宜。
- (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。
- (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°C。

28. 培養基：各節有特別敘明配製方法時，依說明配製，否則均須經 121°C 滅菌 15 分鐘。

- (1) 無菌蒸餾水。
- (2) 蛋白胰緩衝液 (Buffered peptone water, BPW)。
- (3) 加鹽硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液 (Lauryl tryptose broth with 2% NaCl, 2% NaCl-LST)。
- (4) 紫紅膽鹽葡萄糖培養基 (Violet red bile glucose agar, VRBG)：加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度，配製後之培養基確定表面乾燥後才可使用，可放置於 2 ~ 8°C 冰箱中保存，但須於一個月內使用完畢。
- (5) 阪崎腸桿菌培養基 (*Enterobacter sakazakii* agar, ESA)：配製後之培養基確定表面乾燥後使用。
- (6) 腸內細菌科增菌培養液 (*Enterobacteriaceae* enrichment broth,

- EE broth)：加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度，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。
- (7) 胰化酪蛋白大豆培養基 (Trypticase soy agar, TSA)：配製後之培養基確定表面乾燥後使用。
 - (8) 尿素培養液 (Urea broth)：以孔徑 0.45 μm 濾膜過濾後分裝使用。
 - (9) 運動性試驗培養基 (Motility test medium)。
 - (10) 氰化鉀培養液 (Potassium cyanide broth)：取聚蛋白脛 3 g、氯化鈉 5 g、磷酸二氫鉀 0.225 g 及磷酸氫二鈉 5.64 g 加入蒸餾水 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）。
 - (11) 胰化蛋白脛培養液 (Tryptone broth)。
 - (12) MR-VP 培養液 (MR-VP broth)。
 - (13) 溴甲酚紫培養液 (Bromocresol purple broth)：取蛋白脛 10 g、牛肉抽出物 3 g、氯化鈉 5 g 及溴甲酚紫 0.04 g，加入蒸餾水 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 0.2 μm 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。
 - (14) 脫羧酶基礎培養液 (Decarboxylase basal medium)：取蛋白脛 5 g、酵母抽出物 3 g、葡萄糖 1 g 及溴甲酚紫 0.02 g，加入蒸餾水 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。
 - (15) 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基 (Simmons citrate agar)：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。

三、檢液之調製：

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°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. 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°C 培養 18 ~ 24 小時，供作檢液。
3. 環境檢體或塗抹物檢體：
 - (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) 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。

四、鑑別試驗：

1. 選擇性增菌培養：吸取第三節之檢液 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

Angle

18 ~ 24 小時。

2. 分離培養：

(1) 方法一：自第四、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) 方法二：自四、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。

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。

五、鑑定試驗：

1. 初步生化試驗：

(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) 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。

(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。

- (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。
- (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。
 - (i) 鉤取菌體，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。
 - (ii) 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。
 - (iii) 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。
 - (iv) 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。
 - (v) 複染：用哈克氏複染液複染 30 秒鐘，水洗。
 - (vi) 自然風乾。
 - (vii) 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. 生化試驗：

- (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) 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°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。

- (3) 吲哚試驗 (Indole test)：鉤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。
- (4) 歐普氏試驗 (VP test)：鉤菌接種於 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。
- (5) 甲基紅試驗 (Methyl red test)：將第五、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。
- (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°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。
- (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°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。
- (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°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。
- (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°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。

- (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°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。

六、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⁽¹⁾

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	-

試驗項目	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
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⁽¹⁾ *E. sakazakii*、*E. cloacae*、*E. aerogenes*、*E. agglomerans* 及 *E. gergoviae* 之生化反應⁽¹⁾

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% 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。

七、最確數計算：由第六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)。

八、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。

九、參考文獻

1. Grimont, P. A. D. and Grimont, F. 2005. Family I. *Enterobacteriaceae*, pp. 661-669. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Part B: The *Gammaproteobacteria*, Vol. 2: *The Proteobacteria*. Garrity, G. M. (ed). Springer, NY, USA.
2. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. In: FDA Microbiological Methods. (<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>, 2007/09/03)
3. Blodgett, R. 2003. Appendix 2. Most Probable Number from Serial Dilutions. In "FDA Bacteriological Analytical Manual." 8th ed., pp. 2.07-2.12. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
4. Nazarowec-White, M., Farber, J. M., Reij, M. W., Cordier, J. L. and Schothorst, M. 2003. Chapter 22. *Enterobacter sakazakii*. In: International Handbook of Foodborne pathogens. Miliotis, M. D. (ed). Marcel Dekker, NY, USA.

