

藥物食品簡訊

月刊

第 296 期
日期：民國 94 年 8 月 20 日

王全茂 題

發行人：陳樹功 出版者：行政院衛生署藥物食品檢驗局 地址：臺北市南港區昆陽街 161-2 號
電話：(02) 26531318 網址：<http://www.nlfd.gov.tw>

衛生署針對審查美國牛肉之政策聲明 (Policy Statement)

- 一、牛海綿狀腦病(BSE)之感染途徑為飼料污染，因此飼料禁用肉骨粉是最重要的防範措施。流行病學調查研究顯示，BSE 係藉由攝食含有致病因子的肉骨粉傳染，不會透過空氣傳播，亦不會因牛與牛之間的接觸而平行感染，因此飼料禁用肉骨粉是最重要的防範措施。美國在 1997 年立法禁止使用肉骨粉作為反芻動物飼料。
- 二、世界衛生組織(WHO)認定肌肉不具感染力，因此去除特定風險物質(SRM)是確保肉品衛生安全的關鍵。歐洲科學執委會認為 BSE 之感染力主要來自於腦、脊髓及淋巴組織，然而，不論經由自然感染或在實驗環境下以人工方式感染的牛，在罹病的任何階段，肌肉組織中從未證實有 BSE 病原的存在。WHO 亦認定肌肉不具感染力。因此，去除 SRM(30 月齡以上牛隻的腦、頭顱、眼睛、三叉神經節、脊髓、脊柱和背根神經節，以及所有的牛隻的扁桃腺、胸腺、小腸、迴腸末端)是確保肉品衛生安全的主要關鍵。美國農業部食品安全檢查署(FSIS)要求屠宰牛隻時必須去除、隔離及棄置這些部位，杜絕它們進入人類食物鏈。本署則要求進口之美國牛肉 30 月齡以下仍需去除腦、頭顱、眼睛、三叉神經節、脊髓、脊柱和背根神經節，採取比美國更嚴格之措施。
- 三、世界動物衛生組織(OIE)認定即使是動物疾病之疫區，其牛肉若有適當措施亦可貿易。OIE 今年 6 月 2 日亦修正其對於狂牛症疫區間牛肉貿易之規定，對於 30 月齡以下不帶骨牛肉，無論疫區等級如何，只要有適當處理，牛肉皆可自由貿易。
- 四、全世界開放美國牛肉國家有 60 餘國，本署所採行之原則，亦為國際間共同可接受的方式。我國並非唯一開放美國牛肉進口的國家，目前開放美國牛肉進口的國家有加拿大、歐盟、約旦等 60 多個國家，我國並非第一個開放，且尚未有國家因美國牛隻個案檢體檢測出 BSE 陽性乙事下令下架銷毀，加拿大與墨西哥更表示，檢驗結果陽性並不影響其美國牛肉進口政策。
- 五、食品安全應由專業考量，本次美國發佈第二個 BSE 案例後，本署經再次審酌，以參照國際規範且遵行科學實証之原則，認為市售美國牛肉安全無虞，無需下架或

銷燬。惟依據本署審查 BSE 發生國牛肉安全性之評估原則，再度停止美國牛肉進口，俟案內該指標牛的流行病學資料釐清後才會再考慮美國牛肉之進口案。

94 年度畜禽產品中殘留動物用藥檢測結果

為維護消費者飲食的安全，本局近日完成市售畜產品 38 件及禽產品 43 件，總共 81 件畜禽產品殘留動物用藥之檢測。結果與規定符合者 67 件，而不符規定者有 14 件，皆為禽產品，包括雞肉 5 件、雞內臟 1 件檢出恩諾沙星 (enrofloxacin)，雞肉 2 件檢出脫氧羥四環黴素(doxycycline, DC)，雞肉 1 件、雞內臟 6 件檢出乃卡巴精(nicarbazin)，所有檢測結果已刊登於藥檢局網站 <http://www.nlfd.gov.tw/>。

本次抽驗檢體係由各縣市衛生局於其轄區以稽查方式取得，種類包括豬肉、豬內臟、雞肉、雞內臟。檢測項目包括氯黴素(chloramphenicol)、羥四環黴素(oxytetracycline, OTC)、氯四環黴素(chlortetracycline, CTC)、脫氧羥四環黴素(doxycycline, DC)、四環黴素(tetracycline, TC)、乃卡巴精(nicarbazin)、卡巴得(carbadox)及其代謝物 quinoxaline carboxylic acid、氯嘧啶 (clopidox)、恩諾沙星(enrofloxacin)、sarafloxacin、danofloxacin、piromidic acid、oxolinic acid、flumequine 及 nalidixic acid 15 項。

恩諾沙星係用於治療雞隻由細菌或黴漿體引起之呼吸道感染症，脫氧羥四環黴素係用於治療肉雞因細菌引起之感染症，而乃卡巴精係添加於飼料中，預防雞之球蟲病。依據本署 94.4.15 衛署食字第 0940403032 號公告修訂「動物用藥殘留標準」，畜禽產品中不得檢出恩諾沙星及脫氧羥四環黴素，而乃卡巴精於雞肉、雞內臟之殘留標準上限為 0.2 ppm。

對於檢出不符規定之產品，已由地方衛生局及農政機關聯手進行追查，目前皆已查到供貨來源，並由縣市政府分別依「動物用藥品管理法」對其處以新台幣 6 仟元至 3 萬元之罰鍰，且列為加強輔導之對象，以防止其再度違反規定。衛生署建議消費者選購畜禽產品時，最好選購來源明確的畜禽及其製品，譬如具有 CAS 標誌之優良產品或經屠宰衛生檢查合格者，以增進對自身之保障。

多溴聯苯醚類化合物

鄭維智

多溴聯苯醚類化合物 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 在結構上，主要以一個醚鍵將兩個苯環結合在一起，兩個苯環周圍則可連接不同數目的溴原子，最多可連接 10 個溴原子，依所接數目的不同，PBDEs 含有 210 個同源物。PBDEs 為一種防火物質，其具有低反應性及高疏水性之特性，因此在環境中為一種持久性污染物質。依據美國印第安那大學研究人員在期刊「環境科技與技術」撰文中指出，

鮭魚肉檢出結構與多氯聯苯相似之 PBDEs。PBDEs 會經由食物鏈進入人體，貯積在脂肪組織裡，也會經由母乳進入胎兒體內，造成危害，目前有關 PBDEs 的殘留量已經受到各界的重視。

PBDEs 會干擾甲狀腺荷爾蒙、具有神經毒性以及致癌性，目前已經在沈積物、哺乳動物、魚類及母乳中檢出 PBDEs 之殘留，而母乳中 PBDEs 的含量更是逐年增加。由於 PBDEs 具有生物累積性，因此很可能經由食物鏈而進入人體。日本 Ohta 等人研究發現飲食中牛肉、豬肉、雞肉及蔬菜中之 PBDEs 的含量比魚類中的含量為低；西班牙學者 Bocio 等人亦指出食品中以魚類之 PBDEs 含量高於肉品及蔬菜等食品。比較各類食品與母乳中之 PBDEs 含量之關係，發現飲食中攝食魚類之多寡與母乳中 PBDEs 之含量呈正相關；母乳中以 2,2',4,4'-四溴聯苯醚 (2,2',4,4'-TeBDE) 及 2,2',4,4',5,5'-六溴聯苯醚 (2,2',4,4',5,5'-HxBDE) 之含量為最多，而且以 2,2',4,4',5,5'-六溴聯苯醚 (2,2',4,4',5,5'-HxBDE) 在人體中的累積能力最強。國外目前包括日本及西班牙已經針對食品中的 PBDEs 進行監測，美國 FDA 食品安全與營養中心 (CFSAN) 亦著手進行相關研究之評估。

有關 PBDEs 之法規面，美國加州政府預定於 2008 年禁止五溴聯苯醚 (Penta PBDEs) 及八溴聯苯醚 (Octa PBDEs) 的使用，其他州政府包括夏威夷、麻塞諸賽州、紐約州等亦考慮訂定規範或禁止使用；歐盟於 2004 年 8 月禁止兩種最常見的 Penta PBDEs 及 Octa PBDEs 使用於所有的產品，並考慮於 2006 年 7 月禁止十溴聯苯醚 (Deca PBDE) 使用於電器產品。

有關風險分析，瑞典研究人員 Meirnoyté 以及 Norén 指出，就 5 公斤體重嬰兒而言，每天攝食 700 mL 的母乳，其 PBDEs 的平均每日攝取量由 1972 年的 1.5 ng 增加到 1997 年的 84 ng，顯示在 25 年間已經增加了 168 倍之多。西班牙 Bocio 等人進一步依各類食品所含之 PBDEs 估計成人之每日飲食攝取量約為 1.2~1.4 ng/kg body weight/day。

參考文獻：

1. Bocio A., Llobet J. M., Domingo J. L., Corbelia J., Teixidó A, Casas C. 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. J. Agric. Food Chem. 51: 3191-3195.
2. Ohta S., Ishizuka D., Nishimura H., Nakao T., Aozasa O., Shimidzu Y., Ochiai F., Kida T., Nishi M., Miyata H. 2002. Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan. Chemosphere 46: 689-696.
3. Norén K., Meirnoyté D., 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. Chemosphere 40: 1111-1123.
- 4.

食品中產氣英膜桿菌檢驗方法之介紹

楊怡真

前言

產氣英膜桿菌 (*Clostridium perfringens*) 是革蘭氏陽性、不具運動性、能夠產生孢子之厭氧桿菌，廣泛存在於土壤、水、溫血動物及人類的腸道中。此菌產生之各種毒素通常是其引起疾病之致病原因。據文獻報告至少已經確認此菌能夠產生 15 種以上的不同毒素。產氣英膜桿菌之菌株通常依其產生 α -毒素、 β -毒素、 ϵ -毒素及 ι -毒素之能力而區分為 A、B、C、D 及 E 五型，每一型的產氣英膜桿菌各自分別

與特定的人類或獸醫疾病相關。

產氣英膜桿菌可引起人類氣疽及兩種不同的食品中毒症狀：A 型之下痢及 C 型之壞死性腸炎。其中 A 型是最常造成食品中毒的原因之一，例如自 1988 年至 1995 年於挪威是食品中毒原因菌的第一位；於 1993 至 1997 年於美國佔第三位。C 型之症狀很嚴重但發生率很低。A 型產氣英膜桿菌食品中毒之潛伏期為 6 至 24 小時。其症狀為下痢、腹痛，很少發生嘔吐及發燒等現象，症狀幾乎都在 24 小時內自行恢復，造成死亡的個體通常是老年人或是幼兒，死亡原因是脫水。

由於產氣英膜桿菌無法製造 20 種必需胺基酸中的 13 種胺基酸，所以通常存活在蛋白質含量豐富的食物當中。75% 的食品中毒案件之嫌疑食品可追溯至肉類及肉類製品，例如醃牛肉、鮭魚、燉肉、義大利麵及真空包裝豬肉。食品中毒案件通常發生在機關場所及大量製備食物之處。通常受污染的食物經過熱處理，競爭性菌叢被熱殺死，但產氣英膜桿菌的孢子仍可存活，成為主要的菌叢。食物冷卻速度若過於緩慢，且食用前又未再度經過足夠的加熱處理，便會使得孢子萌發並且快速地繁殖。此菌在足夠的蛋白質來源供應下，能夠於 15 至 50°C 生長，世代時間可低至 7 至 8 分鐘。人類若食入大量營養體細胞，使得細胞在小腸中產生孢子而釋放出腸毒素則會致病。

流行病學之證據顯示，在 A 型產氣英膜桿菌所造成的食品中毒案件中，腸毒素扮演了重要的角色。例如，A 型產氣英膜桿菌造成食品中毒之病患的下痢便中，有相當高的比例可以分離到腸毒素陽性的產氣英膜桿菌菌株。此外，人類自願試驗者食入大量純化的腸毒素後，也出現和 A 型產氣英膜桿菌腸毒素陽性菌株所造成之食品中毒患者相同的症狀，這也支持腸毒素為造成 A 型產氣英膜桿菌食品中毒之主因的這個假設。而產氣英膜桿菌腸毒素基因刪除 (gene deletion) 轉形菌株建立後，發現該轉形菌株無法產生腸毒素，也無法引起兔迴腸試驗中的液體蓄積及腸道組織病理學上的變化，因此證實腸毒素可單獨造成 A 型產氣英膜桿菌食品中毒之症狀。

最新適用於食品中產氣英膜桿菌之檢驗方法將其腸毒素之檢驗技術加入。今特就該檢驗方法介紹如後，提供相關研究及檢驗人員參酌，以收事半功倍之效。

1. 適用範圍：例方法適用於食品中產氣英膜桿菌之檢驗。

2. 檢驗方法

2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度約為 100 呎燭光，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 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 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、刮痕或其他缺點。

- 2.2.6 稀釋用容器：附蓋（栓）之 500 mL 廣口瓶或 15 × 150 mm 試管。
- 2.2.7 增菌用容器：20 × 150 mm 試管。
- 2.2.8 厭氧瓶（Anaerobic jar）。
- 2.2.9 氣體包：適合厭氧菌培養者。使用時，反應 30 分鐘後，厭氧瓶內空氣組成為氧氣含量低於 1%，二氧化碳含量介於 9~13%。
- 2.2.10 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.2.11 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.2.12 攪拌均質器（Blender）或鐵胃（Stomacher）：適用於無菌操作者。
- 2.2.13 杜蘭發酵管（Durham fermentation tube）：外徑 9 × 22 mm 或其他適用者。
- 2.2.14 接種針及接種環（內徑約 3 mm）：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.15 加熱板（Hot plate）：具有磁性攪拌功能。
- 2.2.16 吸管輔助器（Pipette aid）或微量分注器。
- 2.2.17 吸管或吸管尖：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度，5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 之刻度。
- 2.2.18 pH 試紙或 pH 測定儀。
- 2.2.19 玻璃棒、剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- 2.2.20 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或 0.2 μm 之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.21 顯微鏡：位相差顯微鏡（phase-contrast microscope）或光學顯微鏡（light microscope），至少可達 1000 倍。
- 2.2.22 試藥：結晶紫（crystal violet）、乙醇、草酸銨（ammonium oxalate）、碘化鉀、碘、沙黃 *O*（safranin *O*）、對-胺基苯磺酸（sulfanilic acid）、醋酸、N-(1-萘基) 乙烯二胺鹽酸鹽 [N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride]、溴瑞酚藍（bromthymol blue）、氫氧化銨、氫氧化鈉、水楊苷（salicin）、棉實糖（raffinose）、氯化鈉、環絲胺酸（D-cycloserine）、碳酸鈉（sodium carbonate）、氯化鈷（cobalt chloride hexahydrate）、抗壞血酸鈉（sodium ascorbate）及鋅粉等均採用化學試藥級。蛋白胨及明膠採用微生物級。
- 2.2.23 試劑
- 2.2.23.1 0.1% 蛋白胨稀釋液（0.1% Peptone dilution fluid）：
取蛋白胨 1 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於稀釋用容器內，以 121 $^{\circ}\text{C}$ 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0 ± 0.2 。
- 2.2.23.2 革蘭氏染色液（Gram stain solution）：
- 2.2.23.2.1 哈克氏（Hucker's）結晶紫液（初染劑）：
溶液 A：取結晶紫 2 g 溶於 95% 酒精 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。

2.2.23.2.2 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，作為媒染劑。

2.2.23.2.3 哈克氏（Hucker's）複染液（複染劑）：

取沙黃 O 2.5 g 溶於 95% 酒精 100 mL 中，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加蒸餾水 90 mL，作為複染劑。

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

2.2.23.3 亞硝酸鹽試驗試劑（Nitrite test reagents）：

試劑 A：取對-胺基苯磺酸 1 g 溶於 5 N 醋酸中，使成 125 mL。

試劑 B：取 N-(1-萘基) 乙烯二胺鹽酸鹽 0.25 g 溶於 5 N 醋酸中，使成 200 mL。

2.2.23.4 0.66 M 碳酸鈉溶液：

取碳酸鈉 7.0 g 溶於蒸餾水中，使成 100 mL，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，注入已滅菌之容器內。

2.2.23.5 0.32% 氯化鈷（ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）溶液：

取氯化鈷 0.32 g 溶於蒸餾水中，使成 100 mL，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，注入已滅菌之容器內。

2.2.23.6 1.5% 抗壞血酸鈉溶液：

取抗壞血酸鈉 1.5 g 溶於蒸餾水，使成 100 mL，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，注入已滅菌之容器內。

2.2.23.7 溴瑞酚藍試紙：

取溴瑞酚藍 2 g 溶於蒸餾水中，使成 1000 mL，再以氫氧化銨使成微鹼性後，將直徑 15 cm 之濾紙浸入該溶液中，取出自然乾燥後，貯存備用。

2.2.23.8 0.04% 溴瑞酚藍溶液：

取溴瑞酚藍 0.2 g 溶於 0.01 N 之氫氧化鈉溶液 32 mL 中，再以蒸餾水稀釋成 500 mL。

2.2.23.9 10% 水楊苷溶液：

取水楊苷 10 g 溶於蒸餾水中，使成 100 mL，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，注入已滅菌之容器內。

2.2.23.10 10% 棉實糖溶液：

取棉實糖 10 g 溶於蒸餾水中，使成 100 mL，再經 0.45 μ m 濾膜過濾後，注入已滅菌之容器內。

2.2.23.11 生理食鹽水：

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

2.2.23.12 逆相被動乳膠凝集 (Reversed passive latex agglutination, RPLA) 試劑套組：可檢驗產氣莢膜桿菌之腸毒素。

2.2.24 培養基

2.2.24.1 胰化蛋白月示—亞硫酸鹽—環絲胺酸培養基
(Tryptose-sulfite-cycloserine agar, TSC)

(a) 基礎培養基 (basal medium)

胰化蛋白月示 (tryptose)	15 g
酵母抽出物 (yeast extract)	5 g
大豆蛋白胨 (soytone)	5 g
檸檬酸銨鐵 (ferric ammonium citrate)	1 g
亞硫酸氫鈉 (NaHSO_3)	1 g
洋菜 (agar)	20 g
蒸餾水	900 mL

加熱沸騰溶解後，調整 pH 值為 7.6 ± 0.2 ，分取 250 mL 注入三角瓶內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

(b) 0.5% 環絲胺酸溶液 (0.5% D-cycloserine solution)

取環絲胺酸 1 g 溶於蒸餾水 200 mL 中，經 0.45 μm 濾膜過濾後，取濾液貯存於冰箱中備用。

(c) 無蛋黃胰化蛋白月示—亞硫酸鹽—環絲胺酸培養基 (egg yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar, EY-free TSC)

將已滅菌之基礎培養基保持在 50°C 左右，於每 250 mL 中徐徐加入 0.5% 環絲胺酸溶液 20 mL，並混合均勻。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入 6~7 mL (雙層培養基用)，於室溫下過夜，使培養基之表面乾燥。未使用者貯存於冰箱中備用，使用時應先檢查有無微生物之污染。

(d) 50% 蛋黃液 (egg yolk emulsion)

雞蛋洗淨，浸入 70% 酒精溶液中 1 小時，以針筒無菌操作取出蛋黃加入等量之無菌生理食鹽水混勻，貯存於 4°C 直至使用。

(e) 蛋黃胰化蛋白月示—亞硫酸鹽—環絲胺酸培養基 (egg yolk tryptose-sulfite-cycloserine agar, EY-TSC)

將已滅菌之 EY-free TSC 保持在 45~50°C，於每 250 mL 徐徐加入 50% 蛋黃液 20 mL，並混合均勻。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿倒入 6~7 mL (雙層培養基用) 或 18 mL (單層培養基用)，以下操作與本節 (c) 相同。

2.2.24.2 改良式肉質培養基 (Cooked meat medium, modified)

(a) 肉質培養基 (Cooked meat medium)

牛心 (beef heart)	454 g
月示蛋腺 (proteose peptone)	20 g
葡萄糖 (glucose)	2 g
氯化鈉 (NaCl)	5 g

(b) 稀釋液

胰蛋白腺 (tryptone)	10 g
硫乙醇酸鈉 (sodium thioglycollate)	1 g
可溶性澱粉 (soluble starch)	1 g
葡萄糖 (glucose)	2 g
1%中性紅溶液 (neutral red)	5 mL
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整 pH 值為 6.8 ± 0.2 ，分取 15 mL 注入 20×150 mm 之試管中。

分取乾燥肉質培養基 1 g 加入稀釋液 15 mL 中，充分混合並靜置直至各粒狀成分皆濕透後，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.24.3 液態硫乙醇酸鹽培養基 (Fluid thioglycollate medium)

胱氨酸 (L-cystine)	0.5 g
氯化鈉 (NaCl)	2.5 g
葡萄糖 (glucose)	5 g
酵母抽出物 (yeast extract)	5 g
胰蛋白腺 (tryptone)	15 g
硫乙醇酸鈉或硫乙醇酸 (sodium thioglycollate or thioglycollic acid)	0.5 g
重氮樹脂酚鹼 (鈉) 溶液 (resazurin, sodium solution 1:1000)	1 mL
洋菜 (agar)	0.75 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分取 10 mL 注入附有螺旋蓋之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘後急速冷卻，最後 pH 值為 7.1 ± 0.2 ，使用時調製。

2.2.24.4 鐵鹽牛乳培養基 (Iron milk medium)

全脂鮮牛乳 (fresh whole milk)	1000 mL
硫酸亞鐵 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1 g
蒸餾水	50 mL

將硫酸亞鐵溶於蒸餾水後，再徐徐注入全脂鮮牛乳中，並一面用磁攪拌器混合均勻，然後分取 11 mL 注入 15×150 mm 之試管內，以 118°C 滅菌 12 分鐘，使用時調製。

2.2.24.5 乳糖—明膠培養基 (Lactose-gelatin medium)

胰化蛋白月示 (tryptose)	15 g
酵母抽出物 (yeast extract)	10 g
乳糖 (lactose)	10 g
酚紅 (phenol red)	0.05 g
明膠 (gelatin)	120 g
蒸餾水	1000 mL

先將胰化蛋白月示、酵母抽出物及乳糖加入蒸餾水 400 mL 中加熱溶解，另將明膠加入蒸餾水 600 mL 中，於 50~60°C 攪拌使之溶解，混合二溶液，並調整 pH 值為 7.5 ± 0.2 ，再加入酚紅。分取 10 mL 注入附有螺旋蓋且已裝有發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘。配製完成之培養基於 8 小時內未使用者，使用前須先在 50~70°C，加熱 2~3 小時，以除去空氣。

2.2.24.6 產芽孢培養液 (Sporulation broth)

聚蛋白腯 (polypeptone)	15 g
酵母抽出物 (yeast extract)	3 g
可溶性澱粉 (soluble starch)	3 g
無水硫酸鎂 ($MgSO_4$)	0.1 g
硫乙醇酸鈉 (sodium thioglycollate)	1 g
磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)	11 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整 pH 值為 7.8 ± 0.1 ，再分取 15 mL 注入附有螺旋蓋之試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.24.7 運動性—硝酸鹽培養基 (Motility-nitrate medium, buffered)

牛肉抽出物 (beef extract)	3 g
蛋白腯 (peptone)	5 g
硝酸鉀 (KNO_3)	1 g
磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)	2.5 g
半乳糖 (galactose)	5 g
甘油 (glycerin)	5 mL
洋菜 (agar)	3 g
蒸餾水	1000 mL

先將各成分（洋菜除外）加熱溶解後，調整 pH 值為 7.3 ± 0.1 ，再加入洋菜，加熱沸騰使完全溶解並混搖均勻後，分取 11 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。配製完成之培養基於 4 小時內未使用者，使用前須先在沸水或蒸汽中加熱 10 分鐘後，於冷水中冷卻。

2.2.24.8 史布雷氏發酵培養基 (Spray's fermentation medium)

胰蛋白腯 (tryptone)	10 g
新蛋白腯 (neopeptone)	10 g

硫乙醇酸鈉 (sodium thioglycollate)	0.25 g
洋菜 (agar)	2 g
蒸餾水	1000 mL

先將各成分（洋菜除外）加熱溶解後，調整 pH 值為 7.4 ± 0.2 ，再加入洋菜，加熱沸騰使完全溶解並混搖均勻後，分取 9 mL 注入附有螺旋蓋且已裝有發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.24.9 改良式 AE 產芽孢培養基 (AE sporulation medium, modified)

聚蛋白腱腱 (polypeptone)	10 g
酵母抽出物 (yeast extract)	10 g
磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)	4.36 g
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	0.25 g
醋酸銨 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	1.5 g
硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
蒸餾水	1000 mL

先將各成分溶解後，以 2 M 碳酸鈉溶液調整 pH 值為 7.5 ± 0.1 ，再分取 15 mL 注入附有螺旋蓋之試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘。滅菌後於每一試管加入 0.6 mL 已過濾無菌之 10% 棉實糖溶液，以及已過濾無菌之 0.66 M 碳酸鈉溶液及 0.32% 氯化鈷溶液各 0.2 mL。測試 1~2 支試管之 pH 值，pH 值應為 7.8 ± 0.1 。使用時先以蒸氣加熱 10 分鐘，冷卻後於每一試管加入 0.2 mL 已過濾無菌之 1.5% 抗壞血酸鈉溶液。

2.2.24.10 改良式 Duncan-Strong 產芽孢培養基 (Duncan-Strong sporulation medium, modified)

月示蛋白腱腱 (protease peptone)	15 g
酵母抽出物 (yeast extract)	4 g
硫乙醇酸鈉 (sodium thioglycollate)	1 g
磷酸氫二鈉 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10 g
棉實糖 (raffinose)	4 g
蒸餾水	1000 mL

先將各成分溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘。使用已過濾無菌之 0.66 M 碳酸鈉溶液調整 pH 值為 7.8 ± 0.1 。

2.3 檢液之調製

2.3.1 檢體之處理 (註 1、註 2)

2.3.1.1 固態檢體先適當切碎，混合均勻後，取 25 g 加入已滅菌之 0.1% 蛋白腱稀釋液 225 mL 中，用攪拌均質器以低速攪拌，攪拌時間不超過 2 分鐘，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.2 粉狀、粒狀或其他易於粉碎的檢體，可用已滅菌之藥勺加以粉碎，並混合均勻。取 25 g 加入已滅菌之 0.1% 蛋白腱稀釋液 225 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.3 液態檢體搖勻後，取 25 mL 加入已滅菌之 0.1% 蛋白胨稀釋液 225 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.4 冷凍檢體須解凍者—魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍（2~5℃，18 小時內即可解凍完全）；亦可使用較高溫度快速解凍（即放在 45℃ 以下的水浴中，可於 15 分鐘內解凍之檢體適用之），解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體的解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者—食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊。取檢體 25 g，以下步驟同 2.3.1.1 節之操作，即為 10 倍稀釋檢液。

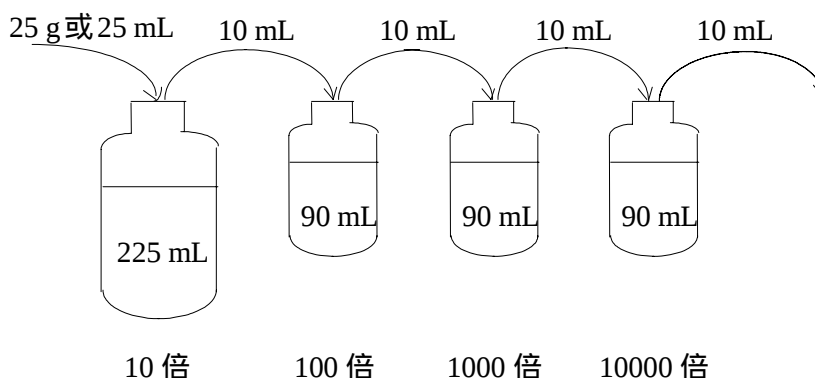
2.3.1.5 凝態及濃稠液態檢體—布丁、煉乳等，經適當攪拌均勻後，取檢體 25 g，以下步驟同 2.3.1.1 節之操作，即為 10 倍稀釋檢液。

註：1. 處理含油脂量多、不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之已滅菌乳化劑（1% Tween 80 等），並充分振搖，使之乳化。

2. 檢體總量不足 25 g (mL)，應依檢體量，添加適量之已滅菌 0.1% 蛋白胨稀釋液，作成 10 倍稀釋檢液。

2.3.2 檢液之處理

分別使用無菌之吸管，以蛋白胨稀釋液，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍、10000 倍……等稀釋檢液，其稀釋方法依下圖所示。



2.4 鑑別試驗

2.4.1 直接分離培養

2.4.1.1 將 2.3 節之稀釋檢液及（或）原液充分搖勻後，分別吸取 1 mL 注入已裝有 EY-free TSC 之培養皿中，每一稀釋檢液至少作二重覆，然後每一培養皿再倒入 15 mL 已冷卻至 45~50℃ 之 EY-free TSC，迅即輕輕搖動，使稀釋檢液與培養基混合均勻，靜置待培養基凝固後，使成雙層培養基（double-layer），正置於 35℃ 厭氧培養 20~24 小時，觀察所形成菌落之生長狀態。菌落為黑色則為可疑之產氣莢膜桿菌，鉤取可疑菌落接種於剛滅過菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，置於 35℃ 厭氧培養 18~24 小時。

2.4.1.2 除 2.4.1.1 節所述方法外，亦可將 2.3 節之稀釋檢液及（或）原液充分搖勻後，分別吸取 0.1 mL 注入已裝有 EY-TSC 之培養皿中，每一稀釋

檢液至少作二重覆，以曲玻棒均勻塗抹於培養基表面上，約 5 分鐘後再倒入 10 mL 已冷卻至 45~50°C 之 EY-free TSC，迅即輕輕搖動，使培養基均勻覆蓋，靜置待培養基凝固後，使成雙層培養基，正置於 35°C 厭氧培養 20~24 小時，觀察所形成菌落之生長狀態。菌落為黑色，外圍有 2~4 mm 不透明之白色環帶，則為可疑之產氣莢膜桿菌，鉤取可疑菌落接種於剛滅過菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，置於 35°C 厭氧培養 18~24 小時。

2.4.2 增菌培養

將已滅菌之改良式肉質培養基於沸水中加熱 10 分鐘，並在不搖動之情況下急速冷卻後，立刻將 2.3.1 節之 10 倍稀釋檢液及（或）原液充分搖勻，並各吸取 2 mL 分別注入 3 或 4 支上述之改良式肉質培養基中後，置於 35°C 培養 24~48 小時，培養基由清澈變為混濁者則應繼續進行鏡檢，惟 2.4.1.1 節或 2.4.1.2 節之分離培養基上有可疑之產氣莢膜桿菌菌落生長時，則本節可省略。

2.4.3 菌數之計算

2.4.3.1 選取 2.4.1.1 節或 2.4.1.2 節含 20~200 個可疑菌落同一稀釋倍數之兩個培養皿予以計數，有不同之可疑菌落時，亦應分別予以計數，其生菌數之表示方式為 CFU/g 或 CFU/mL。

2.4.3.2 計算生菌數時，選取 10 個可疑菌落，經 2.4.4 節、2.4.5 節、2.4.6 節及 2.4.7 節試驗確定為產氣莢膜桿菌者，再依確定之比率計算其生菌數。各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數培養皿之菌落數為 20~200 個時，應以該稀釋倍數之兩個培養皿之菌落數平均值乘其稀釋倍數、確定之比率及稀釋因子，即得其生菌數；但有兩種稀釋倍數之培養皿之菌落數在 20~200 個之間時，則應依下列公式計算之，但記錄生菌數時應將該數字第三位數字四捨五入，使其有效數字為兩位。

生菌數 (CFU/g 或 CFU/mL) =

$$\frac{\left(\frac{Aa + Ab}{2} \right) \times A \times \frac{Ya}{Xa} + \left(\frac{Ba + Bb}{2} \right) \times B \times \frac{Yb}{Xb}}{2} \times F$$

A、B：稀釋倍數。

Aa、Ab：A 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

Ba、Bb：B 稀釋倍數各培養皿內之菌落數。

Xa、Xb：由 A 及 B 稀釋倍數各培養皿內所鉤取之可疑菌落數。

Ya、Yb：由 A 及 B 稀釋倍數各培養皿內所鉤取之可疑菌落，經 2.4.4 節、2.4.5 節、2.4.6 節及 2.4.7 節試驗確定為產氣莢膜桿菌者。

F (稀釋因子)：當選取 2.4.1.1 節之培養皿予以計數時，則 F 為 1；而選取 2.4.1.2 節之培養皿予以計數時，則 F 為 10

(因 2.4.1.2 節之每培養皿內，僅加入稀釋檢液或原液 0.1 mL)。

2.4.4 鏡檢

取 2.4.1 節之液態硫乙醇酸鹽培養基或 2.4.2 節之改良式肉質培養基之菌液，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，自然風乾。
- (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 分鐘後，水洗。
- (4) 脫色：用 95%酒精洗至不再有紫色褪出時，再以自來水沖洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片厚薄而定。
- (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。經上述試驗，其結果為革蘭氏染色陽性且為肥厚之短桿狀細菌，則為可疑產氣莢膜桿菌。

2.4.5 純化

自 2.4.1 節之液態硫乙醇酸鹽培養基或 2.4.2 節之改良式肉質培養基中取一白金耳量培養液，在 EY-TSC 表面上作劃線培養後，置於 35°C 厭氧培養 24±2 小時，觀察所形成菌落之生長狀態。鉤取圓形、直徑約 1~2 mm、呈黃灰色且外圍有 2~4 mm 不透明環帶之菌落，接種於剛滅過菌並急速冷卻之液態硫乙醇酸鹽培養基中，置於 35°C 厭氧培養 24 小時。

2.4.6 鐵鹽—牛乳推定試驗 (Iron-milk presumptive test)

自 2.4.5 節生長良好之培養液中吸取 1 mL，接種於鐵鹽牛乳培養基後，置於 46°C 水浴中培養，經 2 小時以後，每隔 1 小時必須觀察一次是否發生劇烈發酵作用。於 5 小時內，牛乳迅速凝固且碎裂成海綿團而上升到培養基表面者為正反應，否則為負反應。產氣莢膜桿菌為正反應（當劇烈發酵作用發生時，即刻將試管移去，以免溢入水浴中）。

2.4.7 確定試驗

2.4.7.1 運動性試驗 (Motility test)

自 2.4.5 節之 EY-TSC 上鉤菌，穿刺接種於運動性—硝酸鹽培養基中約 1/3 深，並置於 35°C 厭氧培養 24 ± 2 小時。沿穿刺線呈擴散狀生長或培養基呈混濁者為正反應，否則為負反應。產氣莢膜桿菌為負反應。

2.4.7.2 硝酸鹽還原試驗 (Nitrate reduction test)

取亞硝酸鹽試驗試劑 A 0.5 mL 及試劑 B 0.2 mL 加入 2.4.7.1 節已培養 24 小時後之運動性—硝酸鹽培養基中，輕輕搖勻後觀察結果，於 5 分鐘內呈現紫色則為正反應，顏色無變化時加入少許鋅粉並靜置數分

鐘而有紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。產氣英膜桿菌為正反應。

2.4.7.3 乳糖發酵試驗 (Lactose fermentation test)

自 2.4.5 節之 EY-TSC 上鉤菌，接種於乳糖—明膠培養基中後，置於 35°C 厭氧培養 24 小時，顏色由紅色變成黃色且有氣體產生者為正反應，否則為負反應。產氣英膜桿菌為正反應。

2.4.7.4 明膠液化試驗 (Gelatin liquefaction test)

將 2.4.7.3 節已培養 24 小時之乳糖—明膠培養基取出，置於 5°C 冰箱中，經 1 小時而有液化現象者為正反應，否則為負反應。為負反應時，須再置於 35°C 繼續厭氧培養 24 小時後，取出置於 5°C 冰箱中放置 1 小時，再行觀察。產氣英膜桿菌為正反應。

2.4.7.5 產芽孢試驗 (Sporulation test)

自 2.4.5 節之培養液中吸取 1 mL，接種於產芽孢培養液中，並置於 35°C 厭氧培養 24 小時後，作革蘭氏染色並鏡檢，其芽孢為橢圓形、偏中間位置者，為可疑產氣英膜桿菌。經 2.4.7.1 節～2.4.7.4 節試驗中，有任何一項之試驗結果無法判定為可疑產氣英膜桿菌時，則須進行碳水化合物發酵試驗。

2.4.7.6 碳水化合物發酵試驗 (Carbohydrate fermentation test)

取三支已滅菌之史布雷氏發酵培養基於沸水或蒸汽中加熱以除去空氣，並急速冷卻後，第一支試管立刻加入無菌之 10% 水楊苷溶液 1 mL，第二支試管立刻加入無菌之 10% 棉實糖溶液 1 mL，而第三支試管則不加任何溶液（作對照組用）後，分取純化之液態硫乙醇酸鹽培養基 0.1 mL 加入上述三支試管中，置於 35°C 厭氧培養 24 小時後，進行 2.4.7.6.1 節或 2.4.7.6.2 節以觀察其產酸及產氣情形。

2.4.7.6.1 自上述培養 24 小時之三支試管中各取一白金耳量培養液，置於溴瑞酚藍試紙上，顏色無變化或呈現淺綠色者，表示產酸，且發酵管內有氣體產生者即為正反應，否則為負反應。對照組顏色應無變化，且無氣體產生。為負反應時，則繼續培養 48 小時後，再觀察結果。產氣英膜桿菌對於水楊苷之反應為不產酸亦不產氣，對於棉實糖之反應為產酸。

2.4.7.6.2 自培養 24 小時之三支試管中各取培養液 1 mL，分別置入另一試管中，再加入 0.04% 溴瑞酚藍溶液 1 或 2 滴，呈現黃色或淺綠色者表示產酸，且發酵管內氣體產生者即為正反應，否則為負反應。對照組顏色應無變化，且無氣體產生。為負反應時，則繼續培養 48 小時後，再觀察結果。產氣英膜桿菌對於水楊苷之反應為不產酸亦不產氣，對於棉實糖之反應為產酸。

2.5 判定

2.5.1 產氣英膜桿菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗	正反應(+)	負反應(-)	產氣莢膜桿菌之反應(a)
革蘭氏染色	深紫色、短桿菌、肥厚	淡紅色	+
鐵鹽—牛乳推定試驗	牛乳迅速凝固，且破裂成海綿團而上升至培養基表面上之劇烈發酵作用	無劇烈發酵作用	+
運動性試驗	有擴散狀生長或培養基呈混濁	無擴散狀生長或培養基呈透明	—
硝酸鹽還原試驗	紫色	原色(b)	+
乳糖發酵試驗	黃色、產氣	原色、不產氣	+
明膠液化試驗	呈液化現象	不呈液化現象	+
產芽孢試驗	芽孢為橢圓形、偏中間位置	營養菌體	+
水楊苷發酵試驗	產酸及(或)產氣	不產酸、不產氣	—
棉實糖發酵試驗	產酸	不產酸	+

(a)「+」表示 90%以上為正反應，「—」表示 90%以上為負反應。

(b)當無紫色產生時加入少許鋅粉，而呈現紫色者為負反應，否則亦為正反應。

2.5.2 計數

由 2.5.1 節判定為產氣莢膜桿菌陽性者，經 2.4.3.2 節之公式計算其生菌數。

2.6 腸毒素之檢驗

2.6.1 菌株要保存或運送至其他實驗室檢驗者，應先將菌株接種於改良式肉質培養基，35℃培養 24 小時後，置於室溫 24 小時，再保存於 4℃。檢驗時，將上述培養液振盪混合，各取 0.5 mL 接種至 2 支 10 mL 之液態硫乙醇酸鹽培養基。一支試管於 75℃加熱 10 分鐘，再置於 35℃培養 18 小時；另一支試管置於 35℃培養 4 小時。使用上述培養基接種至 15 mL 之改良式 AE 或 Duncan-Strong 產芽孢培養基。

2.6.2 分離之菌株直接進行腸毒素檢驗時，將菌株接種至液態硫乙醇酸鹽培養基 35℃培養 4 小時，再取 0.75 mL 接種至 15 mL 之改良式 AE 或 Duncan-Strong 產芽孢培養基。

2.6.3 將已接種之產芽孢培養基置於 35℃厭氧培養 18~24 小時。以位相差顯微鏡或抹片染色確認產芽孢情形。取部分已產孢之培養液以 10000 × g 離心 15 分鐘，取上清液備用。以逆相被動乳膠凝集試劑套組檢驗上清液是否含有產氣莢膜桿菌腸毒素，操作方法依照各商品說明。

2.7 可參考使用國際間認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。

參考文獻：

1. Andrews, W.H. 1998. Microbiological methods, 976.30 *Clostridium perfringens* in foods. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th ed. pp. 48-50. AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
2. Brynestad S, Granum P.E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. Int J Food Microbiol. 74:195-202.
3. Harmon, S.M. and Rhodehamel, E.J. 2001. *Clostridium perfringens*. In "FDA Bacteriological Analytical Manual". 8th ed. pp. 16.01-6. AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
4. International Organization for Standardization. 1997. ISO 7937 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* - colony-count technique. 2nd ed. pp. 1-10.
5. McNamara A.M., Lattuada C.P. 1998. Examination of meat and poultry products for *Clostridium perfringens*. In "USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook volume 1". 3rd ed. pp. 13.1-7. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C, U.S.A.
6. Sarker M.R., Singh U., McClane B.A. 2000. An update on *Clostridium perfringens* enterotoxin. J Natural Toxins. 9:251-66.

藥物食品檢驗局七月份大事紀

- 7 月 01 日 戴奧辛專案小組獲戴奧辛快速生物檢測(DR CALUX)技術認證。
- 7 月 18 日 衛生署參事蕭美玲蒞局專題演講「赴美國 FDA 考察消費者保護業務報告」。
- 7 月 19 日 邀請衛生署食品衛生處文長安技正蒞局，專題演講「台灣使用食品添加物現況剖析」。
- 7 月 25 日 技士夏蓉蓉赴美國華府，參加「2005 年第 41 屆藥物資訊協會年會」，為期九天。
- 7 月 29 日 組長林哲輝及技士黃坤森赴中國大陸，隨團考察「大陸藥材市場及中藥材栽培基地」，為期十四天。