

藥物食品簡訊

月刊

王金城主編

第 325 期

日期：民國 97 年 1 月 20 日

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> 工本費：10 元

市售芥藍菜檢出雙特松(dicrotophos)農藥殘留

衛生署藥物食品檢驗局進行 96 年度 11 月市售蔬果殘留農藥監測，11 月共抽驗蔬果 149 件。結果有 141 件符合規定，有 8 件蔬果與規定(不得檢出)不符，其中 1 件芥藍菜檢出雙特松(dicrotophos) 0.25 ppm。其餘 7 件分別為 1 件豌豆莢檢出四氯異苯腈(chlorothalonil) 1.23 ppm，2 件青江菜分別檢出得克利(tebuconazole) 0.02 及 0.15 ppm，1 件大陸妹及 2 件小黃瓜分別檢出亞滅培(acetamiprid) 0.02、0.03 及 0.04 ppm，1 件哈蜜瓜檢出納乃得(methomyl) 0.17 ppm。

不符規定之蔬果，已立即通知衛生局追查來源，並依法進行後續處理。依送驗單記載資料及後續之追查，檢出雙特松之芥藍菜供應者為宸陽果菜運銷合作社(嘉義縣大林鎮明和里甘蔗崙 96 之 12 號)。豌豆莢為陳永石(彰化縣二林鎮趙甲里鎮平巷 59-8 號)。2 件青江菜皆為西螺鎮蔬菜產銷班第 16 班(雲林縣西螺鎮詔安里 37-1 號)。2 件小黃瓜分別為南寮社區合作農場(高雄縣彌陀鄉南寮村漁港路 61 號)及台灣青果運銷合作社屏東分社(屏東縣屏東市建華 1 街 104 號 3F)。另大陸妹為趙燕翬(雲林縣二崙鄉港後村 17 鄰港後路 7 號)及哈蜜瓜為蔡天賜(嘉義市西區北興街 401 巷 1 號)，皆已依法懲處。

衛生署訂定蔬果「殘留農藥安全容許量」是行政上之管制點，並不是會造成健康危害之臨界點。本次檢驗結果與規定不符之檢體，依據該等農藥之每日可接受攝取量(ADI)及殘留量進行健康風險評估，以體重 60 公斤成人計，若攝取 100 g，則殘留雙特松 0.25 ppm 之芥藍菜，其攝入量佔 ADI 之 631%。其餘 7 件檢體之農藥攝入量佔 ADI 之 0.1~7%。

建議消費者在選購蔬果時，最好選擇具有良好信譽之商家產品，如 CAS 吉園圃標誌者，以確保飲食安全。蔬菜清洗時，先以水沖洗蔬菜根部，將根部摘除，再以水浸泡 10 至 20 分鐘，之後再沖洗二至三遍，有助於去除殘餘之農藥。

一件牛肉檢體的戴奧辛含量超出限值

衛生署藥物食品檢驗局 96 年度執行「食品中戴奧辛背景值調查計畫」，抽樣 210 件食品中，日前發現有 1 件牛肉檢體的戴奧辛含量疑似偏高，依據「衛生署農委會環保署環境保護與食品安全通報及應變流程」，再次至原採樣地點採樣進行複驗，結果該檢體檢出戴奧辛含量為 12.2 皮克/克脂肪 (pg WHO - TEQ_{PCDD/F}/g fat)，超過衛生署「食品中戴奧辛處理規範」有關牛、羊之肉及其製品的戴奧辛限值 3 皮克/克脂肪 (pg WHO - TEQ_{PCDD/F}/g fat)。該含量對民眾的健康不至產生危害，目前地方政府已對可疑之源頭進行控管。衛生、農政及環保三機關，已啟動跨部會協調機制，以進一步調查確認處理。

該牛肉檢體係於 96 年 12 月 14 日採樣自新竹市林姓攤商。經地方衛生局追查源頭，該產品疑似來自苗栗縣公館鄉劉姓肉牛場。苗栗縣政府於 1 月 9 日至現場稽查，管制牛隻移動。初步了解附近尚無重大污染源，將持續進行調查確認，並對牧場所用之飼料及牧草進行採樣檢驗。

依國際組織食品添加物專家委員會 (JECFA) 的建議，每人每月可接受最高攝取量為 70 pg WHO-TEQ/kg 體重，以 60 公斤體重的人計算，其一生中每月攝取 4200 皮克以下的戴奧辛是安全的。若以本案牛肉提供作為牛肉麵之材料為例，每日攝食牛肉麵 (牛肉約含 75 - 100 g) 一碗，推估終生平均每人每月暴露劑量為 1130 - 1506 皮克，符合國際組織食品添加物專家委員會的建議。故本案牛肉戴奧辛含量雖然超過限值，但對人體健康不會造成影響。

由藥物食品檢驗局以往對食品中戴奧辛背景值的調查，配合全國營養調查所得的各類食品攝取量得知，台灣地區民眾的戴奧辛攝入量不高，因此國人戴奧辛的暴露風險並不高。

衛生署強調，藥物食品檢驗局歷年執行的「食品中戴奧辛背景值調查計畫」，係為瞭解長時間內台灣地區一般民眾由食品中攝入戴奧辛的危害風險，為國家永續發展的工作計畫之一。以往的結果顯示風險甚低，今後除將持續監視評估外，亦將與農業及環保機關共同合作，以期全面降低國人從食物中攝入戴奧辛，維護國民健康。

由於戴奧辛係屬油性物質，易囤積在動物脂肪中，為減少攝入戴奧辛，建議消費者應避免食用過量的動物性油脂。另外均衡的飲食，包括攝食適量的水果、蔬菜及穀類，將有助於避免因單一食物所造成之戴奧辛過量的暴露。

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)：鎳鉻合金、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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 冰箱中，使用時須加溫至 37℃。

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℃ 滅菌 15 分鐘。

- (1) 無菌蒸餾水。
- (2) 蛋白胨緩衝液 (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℃ 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℃ 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)：取聚蛋白腴 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℃ 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) 胰化蛋白腴培養液 (Tryptone broth)。
- (12) MR-VP 培養液 (MR-VP broth)。
- (13) 溴甲酚紫培養液 (Bromocresol purple broth)：取蛋白腴 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℃ 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 ± 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)：取蛋白腴 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℃ 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℃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. 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 已滅菌之蛋白胨緩衝液。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。
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℃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，添加蛋白胨緩衝液 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。

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℃培養

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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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.



藥物食品檢驗局 96 年 12 月份大事記

12 月 03 日 舉辦「流感疫苗品質檢測研討會」。

召開「北區衛生局聯合分工檢驗協調會議」。

12 月 12 日 舉辦「96 年度化粧品檢驗方法之開發與推廣說明會」。

舉辦專題演講：「從 ICH-Q6B 談生物藥品檢驗規格」。

12 月 14 日 舉辦「藥品實施 GMP 制度 25 週年研討會」。

12 月 17 日 發布「96 年度抗生素製劑之品質監測調查結果」。

12 月 19 日 發布「96 年度 11 月份市售蔬果殘留農藥檢驗結果」。

發布「市售芥藍菜檢出雙特松(dicotophos)農藥殘留」。

12 月 26 日 公告檢驗方法：「食品中動物性成分檢驗方法」—牛肉製品中含豬肉成分之定量檢驗、鵝肝製品中鴨肝之定量檢驗。