

102年度金黃色葡萄球菌檢驗之能力試驗

賴南廷 李婉嬪 李明鑫 陳惠芳

食品藥物管理署風險管理組

摘 要

衛生福利部食品藥物管理署(食藥署)舉辦102年度國內實驗室金黃色葡萄球菌檢驗能力試驗，測試樣品係以全脂鮮奶為基質，參與測試之實驗室有22家，包括11個縣市衛生局及11家民間實驗室。測試結果以Robust-Z進行判定， $|Z|$ 值 ≤ 2 為滿意， $2 < |Z| < 3$ 為應注意， $|Z|$ 值 ≥ 3 為不滿意。評列為「滿意」有19家，佔86.4%，「不滿意」有3家實驗室，佔13.6%。本次參加之實驗室為食藥署認證項目者共計8家，僅1家為不滿意結果，其餘皆呈現滿意之結果。透過本次能力試驗，不僅了解國內大多數實驗室對金黃色葡萄球菌檢驗能力表現大致良好，也提供實驗室間檢驗技術能力比較之機會，可作為實驗室持續改進其品質管理系統之參考。

關鍵詞：能力試驗、金黃色葡萄球菌、全脂鮮奶

前 言

食因性疾病是世界主要關注的疾病之一。迄今已發現約有250種不同的食因性疾病，且其中三分之二的食因性疾病係由細菌所引起，而金黃色葡萄球菌更為食因性疾病的主要致病原細菌之一⁽¹⁾。金黃色葡萄球菌為革蘭氏陽性球菌，菌體呈現單一、成對或不規則之簇狀排列，因菌體會產生一種類胡蘿蔔素色素，使菌落呈現黃金色，故被取名為金黃色葡萄球菌⁽²⁾。金黃色葡萄球菌所引起之中毒症狀，主要有噁心、嘔吐、腹瀉等，發病潛伏期約為1至7小時，平均2至4小時，症狀的產生主要與感染菌株產生之腸毒素(enterotoxins)所引起的發炎反應有關⁽³⁻⁴⁾。金黃色葡萄球菌產生之腸毒素會與人體免疫系統中的肥大細胞表面接受體結合，促使其活化並釋放包括組織胺(histamine)、血清素(serotonin)等發炎媒介物質進而造成中毒症狀⁽⁵⁾。

金黃色葡萄球菌廣泛存在於環境及哺乳動

物與鳥類體表，人體的皮膚、毛髮、鼻腔及咽喉等黏膜中均可能發現金黃色葡萄球菌的存在，尤其是化膿的傷口，因此極易經由人體而污染食品，所以帶菌之食品操作人員也常成為金黃色葡萄球菌食品中毒案的污染源頭。⁽⁶⁾衛生福利部食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)目前已訂有食品良好衛生規範(GHP)及食品安全管制系統(HACCP)等規範標準，以加強業者衛生安全管理，避免食品中毒事件發生並確保國民飲食衛生安全。

為了解國內政府機關及民間實驗室對金黃色葡萄球菌之檢驗能力，食藥署於102年舉辦金黃色葡萄球菌檢驗之能力試驗以評估實驗室檢驗能力。

材料與方法

一、材料

(一)基質：全脂鮮奶

(二)菌株：金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus, BCRC 12154)、沃金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*, BCRC 12929)及大腸桿菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)

(三)培養基、試藥及試劑：本能力試驗之培養基、試藥及試劑均依據衛生署98.06.09署授食字第0981800188號公告之「食品微生物之檢驗方法—金黃色葡萄球菌之檢驗」⁽⁷⁾之規定購買及配製。

二、試驗特性及設計

(一)本試驗以4倍稀釋全脂鮮奶為基質，每間實驗室會隨機分配到3組測試樣品及1瓶空白樣品，每組測試樣品分別含金黃色葡萄球菌、沃金黃色葡萄球菌及大腸桿菌，樣品編號以隨機編碼分配，並隨測試樣品附上能力試驗說明書⁽⁸⁻¹¹⁾。

(二)參與本能力試驗計畫實驗室之安排，以實驗室位處地點為區隔方式，以北、中、南區域交錯方式隨機分配次序，各實驗室均以代碼表示，對外一律保密，且實驗室會個別接到能力試驗總體表現報告。

三、樣品配製及運送

(一)樣品之配製

1. 菌種純化

取冷凍保存 (-80℃) 之金黃色葡萄球菌、沃金黃色葡萄球菌及大腸桿菌，分別於胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)培養基上行劃線培養，並於35℃培養18-24小時。

2. 測試樣品配製

本次測試之檢體採購後進行均質並稱重，使用密閉式PE塑膠瓶密封置於室溫貯存待測。

(1)樣品基質：4倍稀釋鮮奶，稀釋液為去離子水。

(2)取冷凍保存之金黃色葡萄球菌標準菌株、沃金黃色葡萄球菌及大腸桿菌，分別於TSA培養基，以35℃培養18-24小時。

(3)由3株標準菌株各取一獨立菌落，分別再活化接種於TSA培養基，以35℃培養18-24小時。

(4)由3株標準菌株TSA培養基上各取數個獨立菌落，以無菌生理食鹽水調整菌液濃度，使用菌液濁度計使菌液濃度落在McFarland 1.0 (約 3×10^8 CFU/mL)。

(5)將調整濃度後之金黃色葡萄球菌菌液，分別以無菌生理食鹽水稀釋100倍後 (約 3×10^6 CFU/mL)，作為(A)菌液。

(6)將調整濃度後之沃金黃色葡萄球菌菌液，分別以無菌生理食鹽水稀釋100倍後 (約 3×10^6 CFU/mL)，作為(B)菌液。

(7)將調整濃度後之大腸桿菌菌液，分別以無菌生理食鹽水稀釋100倍後 (約 3×10^6 CFU/mL)，作為(C)菌液。

(8)取(A)菌液20 mL注入1,980 mL 4倍稀釋鮮奶中，以攪拌器充分混合20分鐘後，以無菌吸管吸取50 mL，分裝入50 mL無菌容器中，作為組別I測試樣品，儲存於4℃備用。

(9)取(B)菌液20 mL注入1,980 mL 4倍稀釋鮮奶中，以攪拌器充分混合20分鐘後，以無菌吸管吸取50 mL，分裝入50 mL無菌容器中，作為組別II測試樣品，儲存於4℃備用。

(10)取(C)菌液20 mL注入1,980 mL 4倍稀釋鮮奶中，以攪拌器充分混合20分鐘後，以無菌吸管吸取50 mL，分裝入50 mL無菌容器中，作為組別III測試樣品，儲存於4℃備用。

(11)不添加菌液之4倍稀釋鮮奶，以無菌吸管吸取50mL，分裝入50mL無菌容器中，作為空白樣品，儲存於4℃備用。

(12)鑑別試驗：

鑑別方法：以VITEK 2取代傳統生化

試驗，其菌種鑑定滿意度達90%以上，即判定測試菌種為VITEK2鑑別出菌種。

(一)樣品均一性及穩定性評估 (表一)

1. 均一性：於配製當日進行，組別I、II、III各取三瓶進行測試，評估以變異數係數10%為合格標準。

2. 穩定性：於配製後第1、4、7、10日進行，組別I、II、III各取三瓶進行測試，評估以變異數係數10%為合格標準。

(三)運送

隨機取樣3個不同編號之樣品，並附能力試驗說明書及樣品領收回函表，由宅急便低溫冷藏運送方式統一配送至各實驗室。

表一、均一性及穩定性測試結果

次數 \ 種類	金黃色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i> BCRC 12154)				
	I			II	III
	定性	定量 (CFU/mL)	定量取 log	定性	定性
寄送檢體當日，均一性					
1	(+)	3.43×10^4	4.54	(-)	(-)
2	(+)	3.70×10^4	4.57	(-)	(-)
3	(+)	3.51×10^4	4.55	(-)	(-)
Mean	—	—	4.55	—	—
SD	—	—	0.02	—	—
CV%	—	—	0.37%	—	—
測試當日/貯存1天，穩定性					
1	(+)	3.33×10^4	4.52	(-)	(-)
2	(+)	4.11×10^4	4.61	(-)	(-)
3	(+)	3.93×10^4	4.59	(-)	(-)
貯存4天，穩定性					
1	(+)	4.15×10^4	4.62	(-)	(-)
2	(+)	4.54×10^4	4.66	(-)	(-)
3	(+)	3.71×10^4	4.57	(-)	(-)
貯存7天，穩定性					
1	(+)	5.92×10^4	4.77	(-)	(-)
2	(+)	5.74×10^4	4.76	(-)	(-)
3	(+)	5.90×10^4	4.77	(-)	(-)
貯存10天，穩定性					
1	(+)	2.36×10^4	4.37	(-)	(-)
2	(+)	3.15×10^4	4.50	(-)	(-)
3	(+)	2.99×10^4	4.48	(-)	(-)
Mean	—	—	4.45	—	—
SD	—	—	0.07	—	—
CV%	—	—	1.5%	—	—

註：本次係針對金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* BCRC 12154)作測試，(+)表示測試樣品為陽性反應；(-)表示測試樣品為陰性反應；—表示無數值

實驗室收到樣品時，應立即置於冰箱冷藏。開封後須立即進行測試。

四、測試方法

樣品測試方法依據衛生署98.06.09署授食字第0981800188號公告之「食品微生物之檢驗方法—金黃色葡萄球菌之檢驗」⁽⁷⁾。其方法簡述如下：

(一)檢體依其狀態分為固態、粉狀及粒狀、液態、凝態及濃稠液態、冷凍等分門別類，並依公告方法所定方式進行處理。

(二)製作10倍、100倍、1,000倍及10,000倍等一系列稀釋檢液。

(三)取稀釋檢液進行鑑別試驗

1. 傳統方法：分離培養、革蘭氏染色(Gram stain)、凝固酶試驗(Coagulase test)、輔助試驗(Ancillary test)、熱安定核酸分解酶試驗(Thermostable nuclease test)。

2. 市售生化檢測套組或鑑定系統：VITEK 2。

五、測試日期及參與之實驗室

本能力試驗係於102年5月14日將檢體分別送至參加實驗室，計有22家實驗室，測試時間為期2週，參與實驗室包含各縣市衛生局計11家及民間檢驗機構計11家。

六、統計方法

本次辦理食品中金黃色葡萄球菌之檢驗分析能力試驗，係針對金黃色葡萄球菌作測試，每個實驗室收到3組測試樣品。其中，添加沃金黃色葡萄球菌之測試樣品II及大腸桿菌之測試樣品III，測試結果為陰性者評定為「滿意」；測試結果為陽性者評定為「不滿意」。添加金黃色葡萄球菌之測試樣品I，測試結果為陽性者，應再進行該菌數之計算，本次以Robust-Z值進行統計，評估實驗室間之表現。

(一)Robust-Z值判定基準為： $|Z| \leq 2$ 為滿意， $2 < |Z| < 3$ 為應注意， $|Z| \geq 3$ 為不滿意。計算公式為Robust-Z值=(測試

值-中位數) / 標準差。

註：名詞解釋及計算公式

1. 中位數(Median)：參加實驗室之測試結果排序後，取其位於1/2處之值。

2. 標準差(σ_p)：ISO 22117及FAPAS建議之標準差⁽¹²⁻¹³⁾，數值為0.25。

(二)直方圖

以測試實驗室之代碼為橫軸、Z值為縱軸，依Z值大小次序作圖，藉以比較參加測試實驗室間的表現。

結果與討論

本次金黃色葡萄球菌檢驗之能力試驗，係針對金黃色葡萄球菌作測試，樣品檢出為陽性時，應再進行該菌數之計算。本次共有22家實驗室參加，試驗以鮮奶為基質，每個實驗室收到3組測試樣品及1瓶空白樣品，測試樣品分別添加金黃色葡萄球菌、沃金黃色葡萄球菌及大腸桿菌。各實驗室之測試結果摘要如下：

(一)測試樣品I：測試結果介於 4.40×10^3 - 3.30×10^4 CFU/mL，Robust-Z值介於-3.03-0.47。實驗室代碼09、19結果為「不滿意」，其餘實驗室結果皆為「滿意」，「滿意」之實驗室佔90.9%。

(二)測試樣品II：測試結果介於陰性與陽性，除實驗室代碼22為「不滿意」外，其餘實驗室結果皆為「滿意」，「滿意」之實驗室佔95.5%。

(三)測試樣品III：測試結果為陰性，所有實驗室結果皆為「滿意」，「滿意」之實驗室佔100%。

上述金黃色葡萄球菌測試結果及統計表如表二至四，實驗室代碼與認證及非認證實驗室對照表如表五，測試實驗室間表現之比較如圖一，本次能力試驗評列為「滿意」之實驗室佔86.4%，其中食藥署認證實驗室計8家，有7家呈現「滿意」結果，1家呈現「不滿意」結果；非食藥署認證實驗室計14家，有12家呈現「滿意」結果，2家呈現「不滿意」結果。由前述可知，食藥署認證實驗室不滿意比

例為12.5%，非食藥署認證實驗室滿意比例為14.3%。

食藥署針對該「不滿意」之認證實驗室進行原因分析，發現其呈現「不滿意」之原

因：(1)檢驗人員取100倍稀釋液0.1mL做鑑定試驗，因此計算倍數時應計為1,000倍，但在計算結果時誤計算為100倍，導致最後結果少了10倍。(2)結果紀錄表上未詳細記錄稀釋過程

表二、金黃色葡萄球菌樣品測試結果

實驗室代碼	測試樣品-I					測試樣品-II		測試樣品-III	
	定性	定量(CFU/mL)	測試結果(log CFU/mL)	Robust-Z值	評定結果	定性	評定結果	定性	評定結果
I-01	陽性	2.60×10^4	4.41	0.06	○	陰性	○	陰性	○
I-02	陽性	2.30×10^4	4.36	-0.15	○	陰性	○	陰性	○
I-03	陽性	2.50×10^4	4.40	-0.01	○	陰性	○	陰性	○
I-04	陽性	2.20×10^4	4.34	-0.23	○	陰性	○	陰性	○
I-05	陽性	3.20×10^4	4.51	0.42	○	陰性	○	陰性	○
I-06	陽性	2.50×10^4	4.40	-0.01	○	陰性	○	陰性	○
I-07	陽性	2.50×10^4	4.40	-0.01	○	陰性	○	陰性	○
I-08	陽性	3.30×10^4	4.52	0.47	○	陰性	○	陰性	○
I-09	陽性	4.40×10^3	3.64	-3.03	●	陰性	○	陰性	○
I-10	陽性	2.81×10^4	4.45	0.19	○	陰性	○	陰性	○
I-11	陽性	2.60×10^4	4.41	0.06	○	陰性	○	陰性	○
I-12	陽性	2.50×10^4	4.40	-0.01	○	陰性	○	陰性	○
I-13	陽性	2.82×10^4	4.45	0.20	○	陰性	○	陰性	○
I-14	陽性	2.70×10^4	4.43	0.13	○	陰性	○	陰性	○
I-15	陽性	2.20×10^4	4.34	-0.23	○	陰性	○	陰性	○
I-16	陽性	2.40×10^4	4.38	-0.08	○	陰性	○	陰性	○
I-17	陽性	2.20×10^4	4.34	-0.23	○	陰性	○	陰性	○
I-18	陽性	2.50×10^4	4.40	-0.01	○	陰性	○	陰性	○
I-19	陰性	—	—	—	●	陰性	○	陰性	○
I-20	陽性	2.40×10^4	4.38	-0.08	○	陰性	○	陰性	○
I-21	陽性	2.40×10^4	4.38	-0.08	○	陰性	○	陰性	○
I-22	陽性	1.74×10^4	4.24	-0.64	○	陽性	●	陰性	○
Median			4.40						
σ_p			0.25						

註：

- (一)測試樣品I 以Robust-Z值判定
- $|Z| \leq 2.0$ 為滿意， $2.0 < |Z| < 3.0$ 為應注意， $|Z| \geq 3.0$ 為不滿意
 - Median為中位數，由實驗室測試結果算出； σ_p 為ISO 22117及FAPAS建議之標準差⁽¹²⁻¹³⁾
- (二)測試樣品II及III定性結果為「陰性」者，評列為「滿意」；定性結果為「陽性」者，評列為「不滿意」
- ：滿意；△：應注意；●：不滿意
- (三)“—”代表無定量值

表三、測試結果之摘要統計表

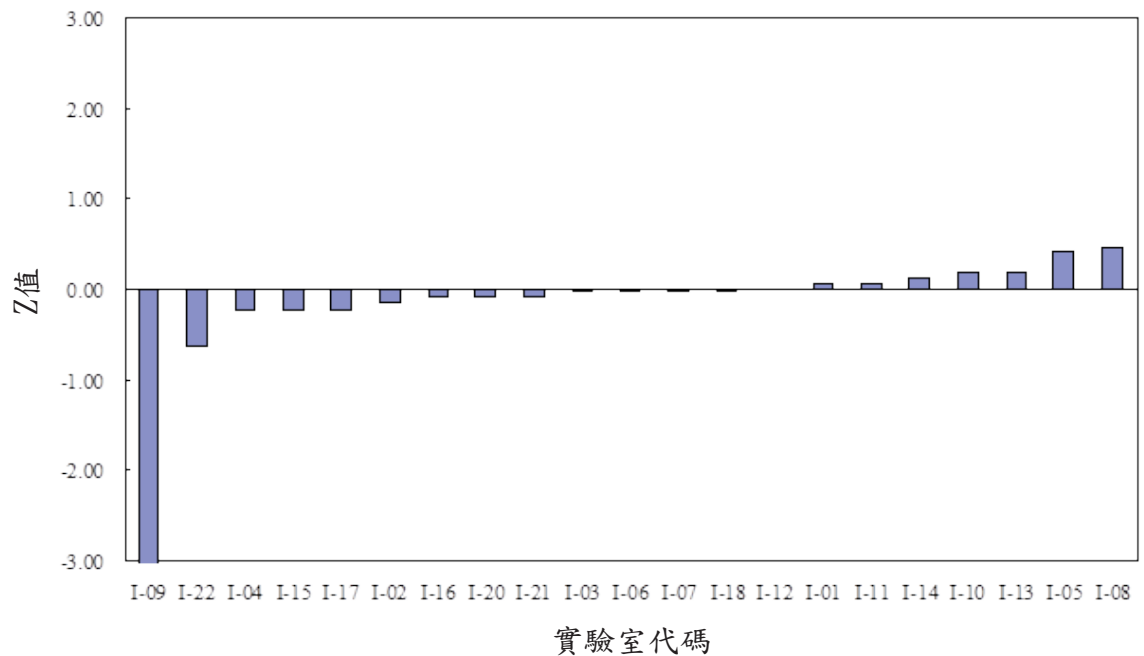
測試樣品	受測實驗室家數	金黃色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i> BCRC 12154)測試結果		
		定性	定量	
			最小值 (CFU/mL)	最大值 (CFU/mL)
I	22家	皆陽性	4.40×10^3	3.30×10^4
II	22家	21家陰性、1家陽性	—	—
III	22家	皆陰性	—	—

—：表無定量值

表四、測試結果之評定統計表

評定結果		金黃色葡萄球菌		
測試樣品		滿意(%)	應注意 (%)	不滿意 (%)
I	(01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22) ^a	20 (90.9)	0	2 (9.1) (09, 19) ^a
II	(01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) ^a	21 (95.5)	0	1 (4.5) (22) ^a
III	(01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) ^a	22 (100)	0	0
總結果	(01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22) ^a	19 (86.4)	0	3 (13.6) (09, 19, 22) ^a

a. 表實驗室代碼



表五、實驗室代碼與認證及非認證實驗室對照表

	認證實驗室	非認證實驗室
實驗室代碼	I-02、I-03、I-07、I-08、I-09、I-11、I-16、I-18	I-01、I-04、I-05、I-06、I-010、I-12、I-13、I-14、I-15、I-16、I-17、I-19、I-20、I-21、I-22

及計算過程，審查時未注意到此問題。上述原因即突顯實驗室管理上結果紀錄之重要性，實驗室應對於整個檢驗流程包含實驗步驟、試劑配製、樣品取樣及稀釋倍數、結果計算等都應有詳細之紀錄，實驗完成後，於檢驗報告出具前應確實檢視紀錄以確認檢驗執行的過程無誤且無人為疏失(例如數據紀錄有誤、計算方式不正確等)，才可出具正式的檢驗報告，如此才可確保實驗室所出具檢驗報告的品質。食藥署後續亦針對該「不滿意」之認證實驗進行複測，其結果為「滿意」，已確認該檢驗實驗室已檢討實驗記錄上之缺失，其品質已獲得改善。

金黃色葡萄球菌是廣泛存在於環境的細菌，極易在人工處理而又不加再加熱的食物上繁殖或不當貯存食物而導致食物中毒，因此該檢測項目相當重要，未來將持續辦理，以提升實驗室間檢驗技術能力，維護國民食品安全。食品藥物管理署將持續藉由舉辦不同品項之能力試驗，以掌握實驗室之檢驗品質，期透過能力試驗提供實驗室間在檢驗技術能力相互比較之機會，作為實驗室持續改進其品質管理系統之參考，並兼具輔助監督管理實驗室之雙重功能。

參考文獻

1. Le Loir Y, Baron F and Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research. 2(1) : 63-76.
2. Jenny Schelin, Nina Wallin-Carlquist and Marianne Thorup Cohn, et. al. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2(6): 580-92.
3. 行政院衛生署食品藥物管理局編輯小組。2012。食品中毒發生與防治100年報。35-37頁，行政院衛生署食品藥物管理局，台北。
4. 高俊偉、賈東明、曹其森、王佑文、廖盈淑、廖春杏、周秀冠、邱乾順。2009。台中市某餐廳便當引發之金黃色葡萄球菌食品中毒事件。衛生署疾病管制局疫情報導，25(5): 314-315。
5. Jett M, Brinkley W and Neill R, et. al. 1990. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys: correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. Infection and Immunity. 58: 3494-9.
6. Wei HL and Chiou CS. 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. Epidemiology and Infection 128: 15-20.
7. 行政院衛生署。2009。「食品微生物之檢驗方法—金黃色葡萄球菌之檢驗」98.06.09署授食字第0981800188號公告。
8. ISO. 2010. Conformity assessment—General requirements for proficiency testing. ISO/IEC 17043. [http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=29366].
9. NATA. 2012. Guide to Proficiency Testing. Australia. [<http://www.pta.asn.au/documents/PTPM-01-1-04-Guide-to-Proficiency-Testing-Australia.pdf>].
10. 行政院衛生署食品藥物管理局。2010。能力試驗標準作業程序。
11. 行政院衛生署食品藥物管理局。2013。食品微生物檢驗方法之確效規範。
12. The Food and Environment Research Agency.

2002. FEPAS® Protocol for the Organisation and Analysis of Data, 3rd Edition. The Food and Environment Research Agency. Sand Hutton, New York, USA.
13. The International Organization for Standardization. 2010. ISO/TS 22117 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. The International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

Results of Proficiency Testing in 2013: *Staphylococcus aureus* in Milk

NAN-TIN LAI, WAN-CHEN LEE, MING-SHIN LEE
AND HWEI-FANG CHENG

Division of Risk Management, FDA

ABSTRACT

A proficiency test was held in 2013 in order to understand the analytical competence of laboratories in testing for *Staphylococcus aureus* in milk. Whole milk was used as the test matrix and was consistent and effective in terms of homogeneity and stability. A total of 22 laboratories participated in the test. The analytical results were analyzed using Robust-Z and categorized as follows: $|Z|$ score ≤ 2 was 'satisfactory', $2 < |Z| < 3$ was 'acceptable' and $|Z| \geq 3$ was 'unsatisfactory'. Among the laboratories evaluated, 19 laboratories were graded as satisfactory and 3 as unsatisfactory. Of the 8 laboratories participated in Taiwan FDA accreditation project, only one laboratory came out with unsatisfactory result, while the rest demonstrated satisfactory outcome. Proficiency test revealed that most laboratories were competent in testing for *Staphylococcus aureus* in milk. It also provided the opportunity for laboratories to assess their performance in relation to other laboratories and make necessary improvements to their quality system.

Key words: proficiency testing, *Staphylococcus aureus*, milk