

比較衛福部腸桿菌科檢驗公告方法與 3M Petrifilm Enterobacteriaceae 及 CompactDry Enterobacteriaceae 之檢測效能

張雅筑¹，歐柏廷²，蔡文城^{2-4*}

天主教輔仁大學食品科學系，新北市¹；台美檢驗科技有限公司，新北市²；國立陽明大學微生物及免疫學研究所³，食品安
全及健康風險評估研究所⁴，台北市，台灣

摘 要

過去，台灣衛生福利部食品藥物管理署訂定大腸桿菌群(coliform)及大腸桿菌(*Escherichia coli*)的檢測作為食品衛生指標檢驗項目，在 2018 年，更提出腸桿菌科(Enterobacteriaceae)檢驗方法（以下簡稱公告方法）。腸桿菌科所涵蓋的菌種種類比大腸桿菌群者為多，顯然地，更具有衛生指標性。市面上，亦有簡便腸桿菌科檢測的方法，主要產品為 3M Petrifilm Enterobacteriaceae（以下簡稱 3M Petrifilm，3M 公司，美國）及 CompactDry Enterobacteriaceae（以下簡稱 CompactDry，NISSUI 公司，日本），然而，據吾等所知，在台灣，此兩種方法的檢測效能尚未有與公告方法的比較報告。本研究選擇 39 件市售手搖飲料利用公告方法進行腸桿菌科之檢測，使用的培養基為 violet red bile glucose agar (VRBGA)，並利用 oxidase（氧化酶）和 O/F glucose（氧化/還原葡萄糖）之生化試驗鑑定 VRBGA 上的生長菌，最後再進行腸桿菌科之計數，所獲得的結果再與 3M Petrifilm 及 CompactDry 的檢測結果進行效能比較。結果指出公告方法、3M Petrifilm 及 CompactDry 的腸桿菌科檢出率分別為 64.1% (25/39)，53.8% (21/39) 及 56.4% (22/39)，根據衛福部食藥署建議之食品及水中腸桿菌科指標菌檢驗的採樣計畫及限量標準，手搖飲料的限量標準為 100 CFU/mL，公告方法檢出飲料不合格率為 30.8% (12/39)，而 3M Petrifilm 及 CompactDry 分別為 23.1% (9/39) 及 20.5% (8/39)，因此，後兩者對飲料中腸桿菌科檢測之偽陰性分別為 25.0% (3/12) 及 33.3% (4/12)。另外，3M Petrifilm 及 CompactDry 在培養結果的判讀方面，顯然地比 VRBGA 不易觀察。基於上述的發現，建議衛生主管單位定期抽檢手搖飲料的衛生安全，並對從業人員進行必要的衛生教育，而品管工作者也需要瞭解使用簡便測試方法的限制性，其等可能發生偽陰性結果或會將超標的檢體誤判為合格。

關鍵字：腸桿菌科(Enterobacteriaceae)、3M Petrifilm、CompactDry、VRBGA、市售手搖飲料

前 言

腸桿菌科(Enterobacteriaceae)成員包括大腸桿菌群(coliform)及其他腸內菌種，主要存在於人類及動物的腸道、土壤、水中，易

造成食物腐敗，大部分不引起疾病，但在宿主抵抗力低、有些伺機性致病菌群大量孳生或菌群失調情況下，細菌會伺機侵犯，引起腹瀉等症狀^[1,2]。

大腸桿菌群一向作為食品或水質的衛生指標菌檢測項目^[3,4]，大腸桿菌群所涵蓋菌種為在 37°C 能分解乳糖產酸產氣之嗜氧性或兼性厭氧性、不產芽孢的革蘭氏陰性桿菌，主要包括 *Escherichia*（埃希氏菌屬）、*Citrobacter*

通訊地址：台美檢驗科技有限公司

24890 新北市新莊區五工五路 21 號 蔡文城

電話：886-(02)2298-9459

E-mail address：wetsai@superlab.com.tw

(檸檬酸桿菌)、*Enterobacter* (腸桿菌屬)、*Klebsiella* (克雷伯氏菌屬) 中的一部分及 *Salmonella* (沙門氏菌屬) 的第三亞屬(能發酵乳糖的細菌)^[5,6]。在 2018 年, 台灣的衛生福利部參考 ISO 21528 公告腸桿菌科直接平板檢驗法^[7](下文簡稱公告方法), 腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)成員包括所有能夠發酵葡萄糖產酸、氧化酶陰性的革蘭氏陰性無芽胞桿菌, 涵蓋的菌種種類較多, 至少包括 134 個菌種以上, 常見的有 13 個菌屬: *Citrobacter* (檸檬酸桿菌)、*Edwardsiella* (愛德華氏菌)、*Enterobacter* (腸桿菌)、*Escherichia* (埃希氏菌)、*Hafnia* (哈夫尼亞菌)、*Klebsiella* (克雷伯氏菌)、*Morganella* (摩根氏菌)、*Providencia* (普羅威登斯菌)、*Serratia* (沙雷氏菌)、*Yersinia* (耶氏菌) 與包括乳糖非發酵性, 但葡萄糖發酵產酸的 *Proteus* (變形桿菌)、*Salmonella* (沙門氏菌) 及 *Shigella* (志賀氏菌) 等菌種^[1,2]。國際食品微生物標準委員會(International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF)於 2011 年出版的 Use of data for assessing process control and product acceptance 書籍建議各類食品加工過程的微生物限量標準和品質檢驗方法, 大部分的食品的衛生指標檢驗已經由腸桿菌科取代大腸桿菌群, 但水質仍然以大腸桿菌群做為衛生指標菌的檢測項目^[8]。另外, 林等^[9]比較臺灣公告腸桿菌科直接平板檢驗法與大腸桿菌群 MPN 法及大腸桿菌群直接平板法的檢測效能指出, 前者所獲得的菌數比後兩者的菌數高, 因此, 對食品的衛生指標而言, 腸桿菌科的檢驗將更具代表性, 預期, 未來食品中腸桿菌科的衛生指標檢驗將變為更普遍, 且公告方法係更能與世界接軌的衛生檢驗方法。

美國 3M 公司生產各種衛生指標及食品病原菌的快檢片, 其中, 檢測腸桿菌科的快

檢片為 3M Petrifilm Enterobacteriaceae Count^[10](下文簡稱 3M Petrifilm); 另外, 日本 Nissui 公司亦推出乾式薄膜快檢培養基 CompactDry Enterobacteriaceae Count^[11](下文簡稱 CompactDry) 裝置, 此兩種裝置皆宣稱操作簡易, 不需要繁瑣步驟即可完成接種與判讀, 此兩種產品也獲得 AOAC 與 MicroVal 國際認證。

為了比較公告方法、3M Petrifilm 及 CompactDry 裝置的效能, 本研究檢測 39 件市售手搖飲料檢體中的腸桿菌科菌數, 再根據檢測結果進行三種方法的效能比較, 同時, 也評估這些市售手搖飲料是否符合衛福部公告的飲料限量標準。

材料及方法

檢體來源

以市售手搖飲料作為檢體進行衛生指標腸桿菌科檢驗, 檢驗方法包括公告方法、3M Petrifilm 及 CompactDry 三種方法, 購買地點為新莊新北產業園區、府中、板橋、新埔等新北地區購買各家飲品店, 採同一天不同家購買的方式, 並模擬一般人購買飲品, 會在當天飲用完畢, 因此, 購買後將在 8 小時內檢測完畢, 本研究共檢測 39 件檢體。

試劑與耗材

3M Petrifilm 及 CompactDry 裝置、稀釋液(Buffered peptone water, BPW)、Violet red bile glucose agar (VRBGA) 選擇性分離培養基、營養瓊脂培養基(Nutrient agar, NA)、葡萄糖之氧化/發酵培養基(O/F Glucose medium)^[6]及氧化酶(oxidase)試劑皆購自啟新生物科技有限公司(新北市, 台灣)。

衛福部公告之腸桿菌科直接平板檢驗法^[7]

取 50 mL 飲料檢體加入 450 mL 蛋白陳緩衝液, 此為 10 倍稀釋液。各取 1 mL 原液

及 10 倍稀釋檢液，分別至無菌培養皿，二重複，再倒入 10-15 mL 之預先煮沸並冷卻至 46°C 的 VRBGA，以劃 8 字混和均勻，待培養基凝固後，再加入 5-10 mL VRBGA 覆蓋平板表層，創造無氧環境使菌落生長較佳及防止一些擴散菌產生。完全凝固後，於 35±1°C 一般培養箱，倒置培養 24±2 小時後，計數平板上菌數量（計數範圍為 15-150 CFU）。典型菌落為有或無沉澱環的紅色或紫紅色菌落。從 VRBGA 平板上至少挑取 5 個（少於 5 個全選）可疑菌落，將其四區劃線於 NA，於 35±1°C 一般培養箱，倒置培養 24±2 小時後，進行 O/F glucose test 及 oxidase test 確認是否為腸桿菌科。

3M Petrifilm Enterobacteriaceae Count 之操作法^[10]

同樣地，各取 1 mL 原液及十倍稀釋檢液，分別滴入至快檢片，並用壓板輕壓 1 分鐘，於 35±1°C 一般培養箱，正培養 24±2 小時後，計數平板上菌數量（計數範圍為 15-100 CFU）。典型菌落為有或無沉澱環的紅色或紫紅色菌落。

CompactDry Enterobacteriaceae Count 之操作法^[11]

同樣地，各取 1 mL 原液及十倍稀釋檢液，分別滴入至測試片，液體會自動擴散，於 35±1°C 一般培養箱，正培養 24±2 小時後，計數平板上菌數量（計數範圍為 15-100 CFU）。典型菌落為有或無沉澱環的紅色或紫紅色菌落。

結 果

利用衛福部公告之腸桿菌科直接平板檢驗法、3M Petrifilm 及 CompactDry 檢測 39 件手搖飲料檢體，若為陽性，前者取 15-150 CFU 計數範圍，而後兩者取 15-100 CFU 計

數範圍內之培養基進行計數，及觀察其菌落形態，並取至少 5 個可疑菌落利用 NA 的移種加以純化，再進行生化試驗(oxidase test 及 O/F glucose test)，最後代入公告方法中的公式進行計算，得出最終結果。

39 件飲料檢體結果分別呈現於表 1，其中有 14 件未檢出及有 12 件均超過計數範圍（菌數太多而無法計算，TNTC），因此，不能做為比較之用，本研究以介於未檢出及 TNTC 中間的 13 件陽性結果針對操作方法進行生長菌數的多寡比較，結果發現依照公告方法操作，其檢出之菌落數較多（表 1），且易於計數，而相較下，3M Petrifilm 及 CompactDry 這兩種方法所檢出之菌落數大多低於公告方法，且不易計數。根據衛福部食藥署建議之食品及水中腸桿菌科指標菌檢驗的採樣計畫及限量標準中，手搖飲料的腸桿菌科限量標準為 100 CFU^[12]，本研究經統計發現手搖飲料之衛生不合格率高達 30.8% (12/39)。經統計手搖飲料陽性件數中的菌數範圍，與公告方法相比，若陽性或陰性是以 100 為決定值，3M Petrifilm 及 CompactDry 之偽陰性（檢驗失誤率）分別為 25.0%(3/14)及 33.3%(4/12)，若以有否長出腸桿菌科為決定值，則為 28.6% (4/14)及 21.4% (3/14)（表 2），因此，3M Petrifilm 與 CompactDry 兩者之檢測效能皆有其限制，檢驗室若使用 3M Petrifilm 及 CompactDry 做為檢測腸桿菌科的方法，可能發生偽陰性結果或會將超標的檢體誤判為合格。

討 論

以公告方法檢測 39 件手搖飲料檢體發現大於 100 CFU 標準的件數高達 30.8% (12/39)。又衛福部最新公告的飲料採檢計畫為三級抽樣方案(Three-class plans)，建議採樣 5 個檢體(n)，若超過 3 個檢體的菌數(c)，介於 m 值及 M 值之間(10~100 CFU/mL)的限量，也視為不合格。^[12]因此推算不合格率將高於本研

表 1. 利用衛福部公告之直接平板檢驗法、3M Petrifilm 及 CompactDry 裝置檢測 39 件手搖飲料所獲得之腸桿菌科菌數結果

檢體編號	方 法		
	公告方法	3M Petrifilm	CompactDry
1	<1 *	<1	<1
2	<1	<1	<1
3	3	10	4
4	13	26	21
5	22	5	2
6	2.5	<1	<1
7	TNTC	TNTC	TNTC
8	19	1	1
9	<1	<1	<1
10	8.5	<1	2
11	<1	<1	<1
12	88	69	42
13	<1	<1	<1
14	59	27	42
15	4.5	<1	1
16	<1	<1	<1
17	TNTC	TNTC	28
18	4.5	<1	<1
19	TNTC	<1	<1
20	<1	<1	<1
21	1	14	10
22	11	10	1
23	TNTC	TNTC	TNTC
24	TNTC	2	3
25	TNTC	27	22
26	<1	<1	<1
27	TNTC	TNTC	TNTC
28	65	9	3
29	TNTC	TNTC	TNTC
30	TNTC	TNTC	TNTC
31	TNTC	TNTC	TNTC
32	<1	<1	<1
33	<1	<1	<1
34	<1	<1	<1

35	<1	<1	<1
36	<1	<1	<1
37	TNTC	TNTC	TNTC
38	<1	<1	<1
39	TNTC	TNTC	TNTC

*檢體的生長菌落單位為 CFU/mL。粗黑體字的檢體編號所獲得的菌數係用於比較菌數多寡之用。

表 2. 根據衛福部公告腸桿菌科直接平板檢驗法、3M Petrifilm 及 CompactDry 裝置所獲得的結果進行分析比較

菌數範圍(CFU/mL)	方 法		
	公告方法	3M Petrifilm	CompactDry
> 100	12*	9	8
10 - 99	7	7	6
1 - 10	6	5	8
未檢出	14	18	17
總計	39		

*單位為：件數。

究的發現。衛生不合格的原因通常歸因於原料、冰塊、製造過程、環境以及飲料從業人員的衛生習慣。為了大眾健康，衛生主管單位有必要定期抽檢市售飲料店的飲品以及對從業人員進行衛生教育。

有些檢驗室為了簡化其品管流程而使用 3M Petrifilm 及 CompactDry 簡便套組之裝置，本研究指出其風險為會發生偽陰性以及將不合格的飲品視為合格，探討其發生原因，可能為 3M Petrifilm 及 CompactDry 所用培養基的型式與公告方法不同，且兩種裝置較小型（約 55 mm 大小），在觀察計數上與公告方法相比會較不易判讀，有時，使用 3M Petrifilm 裝置時，檢液會擴散至培養薄膜外，而造成計數結果上之差異。此結果值得品管人員的參考。

張等^[13]比較 3M 生產的 Petrifilm *E. coli*/coliform count plate (AOAC 991.14) 方法^[14]與中華民國國家標準(CNS)(coliform: CNS

10984) 方法，結果指出此產品的偽陰性率高達 51.5% (17/33)，尤其不能檢出低菌量的 *co*-*li*form，檢出率僅為 22.7% (5/22)。本研究亦發現 3M Petrifilm 檢驗腸桿菌科的偽陰性高且不能檢出低菌量。

本研究根據公告方法，利用 VRBGA 進行接種檢體外，亦同時操作含 10 g/L 葡萄糖之 violet red bile agar (VRBA) 的傾注平板，結果發現含 10 g/L 葡萄糖的 VRBA 其菌落大小較 VRBGA 者大，兩種成分中最大差異在於含 10 g/L 葡萄糖的 VRBA 比 VRBGA 多了乳糖，因此，可能腸桿菌科生長菌落在消耗葡萄糖後再利用乳糖進行代謝（會利用乳糖之菌種）。不過檢測上，VRBGA 與含 10 g/L 葡萄糖的 VRBA 上的生長菌落數目並無明顯的差異。

進一步分析市售手搖飲料檢體的類型（無糖、全糖、不含料及含料四種），發現飲料成分中無糖且不含料者之檢測結果，合格率

較高；而全糖及含料者之檢測結果有較高的機率出現菌量超標（不合格）之情形。不過，仍要考慮其它因素，如：原料品質、配製者之衛生習慣、店家衛生環境及飲品存放環境，因此，從源頭到消費者飲用的各個環節中，飲料的衛生管控是非常重要的。

雖然，公告方法獲得檢測結果為 48 小時，但本研究發現若在培養 24 小時進行初步判讀，菌數的變化並不大，雖然 3M Petrifilm 及 CompactDry 簡便套組號稱是屬於快速檢驗方法，但也需在 24 小時後才能判讀，因此，公告方法的檢測時效並不比簡便套組差。另外，整體上，雖然 3M Petrifilm 及 CompactDry 的方法在操作與檢驗材料準備上較為方便，但其檢測效能較低於公告方法，因此，這兩種方法不太能取代此腸桿菌科直接平板檢驗法。

參考文獻

1. Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 11th ed., 2015:685-713. ASM press, Washington DC, USA.
2. Forsythe SJ, Abbott SL, Pitout J. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other *Enterobacteriaceae*. In Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW (eds). Manual of Clinical Microbiology. 11th ed., 2015:714-37. ASM press, Washington DC, USA.
3. 行政院衛生福利部食品藥物署。食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌群之檢驗。衛授食字第 1021950329 號公告修正。2013。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
4. Hitchins AD, Feng P, Watkins WD. *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytic Manual. 8th ed. Revision A. 1998:5.01-20. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
5. 蔡文城，蔡岳廷。食品微生物檢驗技術。2019: 269-86。九州圖書文物有限公司，台北，臺灣。
6. Montville TJ, Matthews KR, Kniel KE. Food Microbiology: an introduction. 3rd ed. 2012:87-105. ASM press, Washington DC, USA.
7. 行政院衛生福利部食品藥物署。食品微生物之檢驗方法—腸桿菌科之檢驗。衛授食字第 1071901433 號預告訂定。2018。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance. 2011. Springer, New York, USA.
9. 林宜瑩，歐柏廷，蔡文城。比較台灣公告腸桿菌科之直接平板檢驗法與台灣之大腸桿菌群 MPN 法及中國大陸國標大腸桿菌群直接平板法的檢測效能。檢驗及品保雜誌 2018; 7:179-85。
10. Silbernagel KM, Lindberg KG. 3M Petrifilm Enterobacteriaceae count plate method for enumeration of *Enterobacteriaceae* in selected foods: collaborative study. J AOAC Int 2003; 86:802-14.
11. CompactDry: Simple and Easy Dry Media for Microbial Count and Detection. <https://www.nissui-pharm.co.jp/pdf/products/global/global04.pdf>
12. 行政院衛生福利部食品藥物署。食品微生物衛生標準草案。衛授食字第 1071300279 號公告。2018。行政院衛生福利部食品藥物管理署，台灣。
13. 張玉芝，蔡岳廷，林冠慧，蔡文城。以 CNS 方法與 Petrifilm 偵測食品中 Coliform（大腸桿菌群）及 *Escherichia coli*（大腸桿菌）之比較。檢驗及品保雜誌 2012; 1:87-91。
14. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). AOAC Official Method 991.14: Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods. Dry Rehydratable Film (Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plate™ and Petrifilm™ Coliform Count Plate™) Methods. 2010. AOAC International, Maryland, USA.

Evaluation of 3M Petrifilm Enterobacteriaceae and CompactDry Enterobacteriaceae Methods

Ya-Zhu Zhang¹, Po-Ting Ou², Wen-cherng Tsai^{2-4*}

¹Department of Food Science, Fu Jen Catholic University, New Taipei City ; ²Super Laboratory Ltd., New Taipei City ; ³Institute of Microbiology and Immunology, and ⁴Institute of Food Safety and Health Risk Assessment, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Abstract

In the past, the Food and Drug Administration (FDA) of Taiwan Ministry of Health and Welfare demanded detection of coliform and *Escherichia coli* as food hygiene indicators. In 2018, it was expanded to detect Enterobacteriaceae which covers more bacterial species than coliform group. Simplified Enterobacteriaceae detection methods such as 3M Petrifilm Enterobacteriaceae (3M Company, USA) and CompactDry Enterobacteriaceae (NISSUI Company, Japan) are commercially available. However, the efficacy of these methods has not been compared to that of the standard method recommended by Taiwan FDA (TFDA). In this study, 39 hand-shake drinks were tested for Enterobacteriaceae by 3M Petrifilm and CompactDry, and the results were compared to those of the standard method using violet red bile glucose agar (VRBGA). Biochemical tests of oxidase and O/F glucose were used to identify the colonies grown on VRBGA. Results showed that the detection rates of Enterobacteriaceae by VRBGA, 3M Petrifilm,

and CompactDry were 64.1% (25/39), 53.8% (21/39), and 56.4% (22/39), respectively. Based on TFDA requirement of less than 100 CFU/ml of Enterobacteriaceae in each sample, the unsatisfactory rate of drinks examined by VRBGA was 30.8% (12/39), while those of 3M Petrifilm and CompactDry were 23.1% (9/39) and 20.5% (8/39), respectively. Therefore, the false negative rates of the latter two methods for the detection of Enterobacteriaceae in drinks were 25.0% (3/12) and 33.3% (4/12) respectively. In addition, interpretation of 3M Petrifilm and CompactDry results was harder than those of VRBGA. Based on results of this study, we urge that food quality control workers understand the limitations of simplified Enterobacteriaceae test methods as they may result in false negative results or misjudgement in food safety control.

Keywords: Enterobacteriaceae 、 3M Petrifilm 、 CompactDry 、 VRBGA 、 hand-shake drinks