

食品微生物之檢驗方法－化膿鏈球菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Streptococcus pyogenes*

第一部：化膿鏈球菌之分離與鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中化膿鏈球菌(A群鏈球菌)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌後，以選擇性培養基培養，配合化膿鏈球菌鑑定之方法。
 - 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。
 - 2.2. 器具及材料
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
 - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.7. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
 - 2.2.8. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.9. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.10. 旋渦混合器。
 - 2.2.11. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.12. 加熱器。
 - 2.2.13. 攪拌器。
 - 2.2.14. 吸管輔助器或微量吸管。
 - 2.2.15. 吸管：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刻度。
 - 2.2.16. 吸管尖：10 μL 、20 μL 、200 μL 及1000 μL 。
 - 2.2.17. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐 121°C 濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。
 - 2.2.18. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
 - 2.2.19. 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。

- 2.2.20. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.21. 燈箱：觀察血清試驗用。
- 2.2.22. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.23. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.25. 試藥：氯化鈉、氫氧化鈉、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、草酸銨(ammonium oxalate)、沙黃O(safranin O)、碘化鉀、碘、結晶紫(crystal violet)、95%乙醇、葡萄糖(glucose)、疊氮化鈉(sodium azide)、鹽酸及過氧化氫均採用試藥級；蛋白胨(peptone)、牛肉抽出物(beef extract)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、去纖維綿羊血(defibrinated sheep blood)及洋菜(agar)均採用微生物級。
- 2.2.26. 試劑
- 2.2.26.1. 1 N氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉40 g，溶於蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.26.2. 1 N鹽酸溶液：取鹽酸89 mL，溶於蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.26.3. 3%過氧化氫溶液：取30%過氧化氫溶液1 mL加蒸餾水使成10 mL，使用時新鮮配製。
- 2.2.26.4. 生理食鹽水：取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水使成1000 mL，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.27. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)
- 2.2.27.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)
- 溶液A：取結晶紫2 g，溶於95%乙醇20 mL。
- 溶液B：取草酸銨0.8 g，溶於蒸餾水80 mL。
- 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。
- 2.2.27.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)
- 取碘化鉀2 g及碘1 g，置於研鉢中，經研磨5~10秒，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蒸餾水，將此溶液注入褐色試藥瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成300 mL。
- 2.2.27.3. 哈克氏複染液(複染劑)
- 取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，供作複染原液。使用時，取原液10 mL加入蒸餾水90 mL，作為複染液。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，需注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.28. L-pyrrolidonyl aminopeptidase (PYR) 檢測套組：含已帶有 L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide 成分之紙錠及 *p*-dimethylaminocinnamaldehyde 呈色用試劑之市售 PYR 檢測套組。

2.2.29. 枯草桿菌素(bacitracin)紙錠：市售0.04單位枯草桿菌素紙錠。

2.2.30. 抗血清：可執行包含化膿鏈球菌在內之鏈球菌分群鑑別用乳膠凝集套組。

2.2.31. 培養基

2.2.31.1. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA)

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	15 g
植物蛋白朊(phytone peptone)	5 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2。

2.2.31.2. 疊氮化物葡萄糖培養液(Azide glucose broth)

蛋白朊(peptone)	15 g
牛肉抽出物(Beef extract)	4.5 g
葡萄糖(glucose)	7.5 g
氯化鈉	7.5 g
疊氮化鈉(sodium azide)	0.2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.2.31.3. 綿羊血培養基(Sheep blood agar)

基礎培養基

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	15 g
植物蛋白朊(phytone peptone)	5 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值

為 7.3 ± 0.2 。冷卻至 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ ，加入去纖維綿羊血50 mL，搖動混合均勻，每一培養皿倒入20 mL。

2.3. 檢液之調製

- 2.3.1. 固態檢體：適當切碎混合均勻後，取檢體25 g，加入疊氮葡萄糖培養液225 mL，混合均勻，供作檢液。
- 2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：可用已滅菌之藥勺或其他方便使用之用具加以粉碎後，混合均勻，取檢體25 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。
- 2.3.3. 液態檢體：可用振搖方式，使充分均勻混合，取檢體25 mL，即為原液，以下步驟同2.3.1.節之操作。
- 2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ ，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於 45°C 以下之水浴中，可於15分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、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.節之操作。
- 2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等，經適當攪拌均勻後，取檢體25 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。

註2：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，充分振搖，使之乳化。

註3：檢體總量不足25g (mL)時，應依檢體量，添加適量之疊氮葡萄糖培養液，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。

2.4. 鑑別試驗

- 2.4.1. 增菌培養：將2.3.節之檢液混合均勻，於 35°C 培養18~24小時。
- 2.4.2. 分離培養：由2.4.1.節之增菌培養液取一接種環量，在綿羊血培養基表面劃線後，於 35°C 培養18~24小時，觀察所形成菌落之型態，若為可疑化膿鏈球菌者，在綿羊血培養基之菌落形態呈現光滑、灰白色、直徑約在 $0.5 \sim 1.5\text{mm}$ 且有明顯 β -溶血透明環之產生，挑取至少3個可疑菌落接種於TSA培養基上，置於 35°C 培養18~24小時後，供作生化試驗及血清型別試驗用。
- 2.4.3. 革蘭氏染色(Gram stain)
 - (1) 加適量無菌生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)自2.4.2.節之TSA培養基上鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾

後迅速通過火焰3~4次微熱固定，勿直接火烤。

- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘，水洗。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘，水洗。
- (4) 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水洗，此步驟僅約30秒，惟視抹片之厚薄而定。
- (5) 複染：用哈克氏複染液複染30秒，水洗。
- (6) 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。化膿鏈球菌為革蘭氏陽性，菌體呈球形或卵圓形，直徑約在0.5~1.5 mm，呈鏈狀排列，短者4~8個細菌組成。

2.4.4. 生化試驗

2.4.4.1. 觸酶試驗(Catalase test)

自2.4.2.節之TSA培養基上鉤菌，塗抹於載玻片上，加3%過氧化氫溶液1~2滴，觀察有無氣泡產生，產生氣泡者為正反應，否則為負反應。化膿鏈球菌應為負反應。

2.4.4.2. PYR試驗

取10 μL無菌水潤濕PYR基質紙錠，自2.4.2.節之TSA培養基上鉤取3~5個菌落置於PYR基質紙錠，於35°C培養15分鐘。加入1~2滴PYR呈色試劑，觀察有無粉紅色出現，產生粉紅色者為正反應，否則為負反應。化膿鏈球菌應為正反應。

2.4.4.3. 枯草桿菌素感受性試驗(Bacitracin sensitivity test)

取2.4.2.節之綿羊血培養基上可疑之單一菌落於另一綿羊血培養基進行次培養，並於密集劃線處貼上含0.04單位枯草桿菌素的紙錠，於35°C培養18~24小時。觀察有無抑菌環出現，產生抑菌環者為正反應，否則為負反應。化膿鏈球菌應為正反應。

2.4.5. 血清型別試驗

自2.4.2.節之TSA培養基上鉤取3~5個菌落，懸浮於鏈球菌萃取酵素溶液中，於35°C培養10分鐘，用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量菌液到每一個格位的下方位置，在格位之上方各滴入1滴化膿鏈球菌血清乳膠凝集試劑，於另一格位滴入一滴無菌水作為對照組，反覆傾斜1分鐘，使充分混合均勻。正反應者有凝集現象，負反應者及對照組則為無凝集現象。化膿鏈球菌應為正反應。

註4：PYR試驗及血清型別試驗可參考使用經確效認可之市售套組，並依其產品說明進行檢測。

2.5. 判定

2.5.1. 化膿鏈球菌陽性者，應符合下表所列之結果

試 驗	正反應	負反應	化膿鏈球菌 之反應
革蘭氏染色	陽性 (深紫色)	陰性 (淡紅色)	+
β-溶血試驗	具溶血 透明現象	無左述現象	+
觸酶試驗	有氣泡產生	無氣泡產生	—
PYR試驗	粉紅色	無色/淡黃色	+
枯草桿菌素 感受性試驗	明顯抑菌環	無左述現象	+
血清型別試驗	凝集	無凝集	+

2.6. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

第二部：化膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於化膿鏈球菌菌種基因之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、real-time PCR試劑配製及real-time PCR等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。

2.2. 裝置^(註1)

- 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
- 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
- 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
- 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
- 2.2.5. 微量冷凍離心機：可達20000 ×g，並具4°C溫控功能。
- 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。
- 2.2.7. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
- 2.2.8. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
- 2.2.9. 旋渦混合器。
- 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
- 2.2.11. 天平：最大稱重量為2000 g，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g，靈敏度為1 mg。

註1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

- 2.3.1. DNA抽取用：適用於革蘭氏陽性細菌DNA抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 化膿鏈球菌菌種鑑別基因(標的基因：*spy1258*)

引子F：5'-GCACTCGCTACTATTTCTTACCTCAA-3'

引子R：5'-GTCACAATGTCTTGGAAACCAGTAAT-3'

探針P：5'-(FAM)-CCGCAACTCATCAAGGATTTCTGTTA
CCA-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小97 bp

註2：合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20°C貯存備用，另探針需避光保存，探針5'端採用6-carboxy-fluorescein (FAM) 標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ-1)標記。

2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System)

本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。

2.3.3. 對照用物質：化膿鏈球菌參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 微量吸管：2 µL、10 µL、20 µL、100 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：可滅菌。10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應管：100 µL。

2.4.5. Real-time PCR反應盤：具96個反應孔，適用於Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

註3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液^(註4)

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 µM引子F 2.0 µL

5 µM引子R..... 2.0 µL

5 µM探針..... 1.5 µL

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit 12.5 µL

檢體DNA溶液..... 5.0 µL

無菌去離子水 2.0 µL

總體積 25.0 µL

註4：Real-time PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之DNA溶液製備

自第一部2.4.1.節之培養液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離心管中，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸10分鐘，取出離心管，作為檢體DNA原液，置於-20°C冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取DNA法

採用適用於革蘭氏陽性細菌DNA抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取DNA。抽取之DNA溶液收集至已滅菌之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，置於-20°C冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自培養基上鉤取一接種環的菌量，置入含有1 mL無菌去離子水之已滅菌1.5 mL離心管中，振盪混合均勻，煮沸10分鐘，取出離心管，待冷卻後以15000 ×g離心3分鐘，吸取上清液至另一已滅菌1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，置於-20°C冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行檢體DNA原液之製備。

2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷

取適量之檢體DNA原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定260 nm及280 nm之吸光值(O.D.)。以波長260 nm吸光值乘50 ng/μL及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗^(註5)

2.7.1. Real-time PCR操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液、引子及探針備用。取已滅菌之1.5 mL離心管，依照2.5.節配製real-time PCR溶液，依序加入TaqMan[®] Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝20 μL至real-time PCR反應盤的反應孔中，各別加入檢體DNA溶液5 μL，再將real-time PCR反應盤置於離心機中，以200 ×g瞬間離心，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

2.7.1.1. 化膿鏈球菌菌種鑑別基因(*spy1258*)反應條件

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	2 min
2. 最初變性	95°C	15 sec
3. 黏接、延展	60°C	30 sec

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

檢體DNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.3. 確認

檢體DNA之real-time PCR增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體DNA與化膿鏈球菌之正反應對照組之real-time PCR螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該real-time PCR增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有化膿鏈球菌。

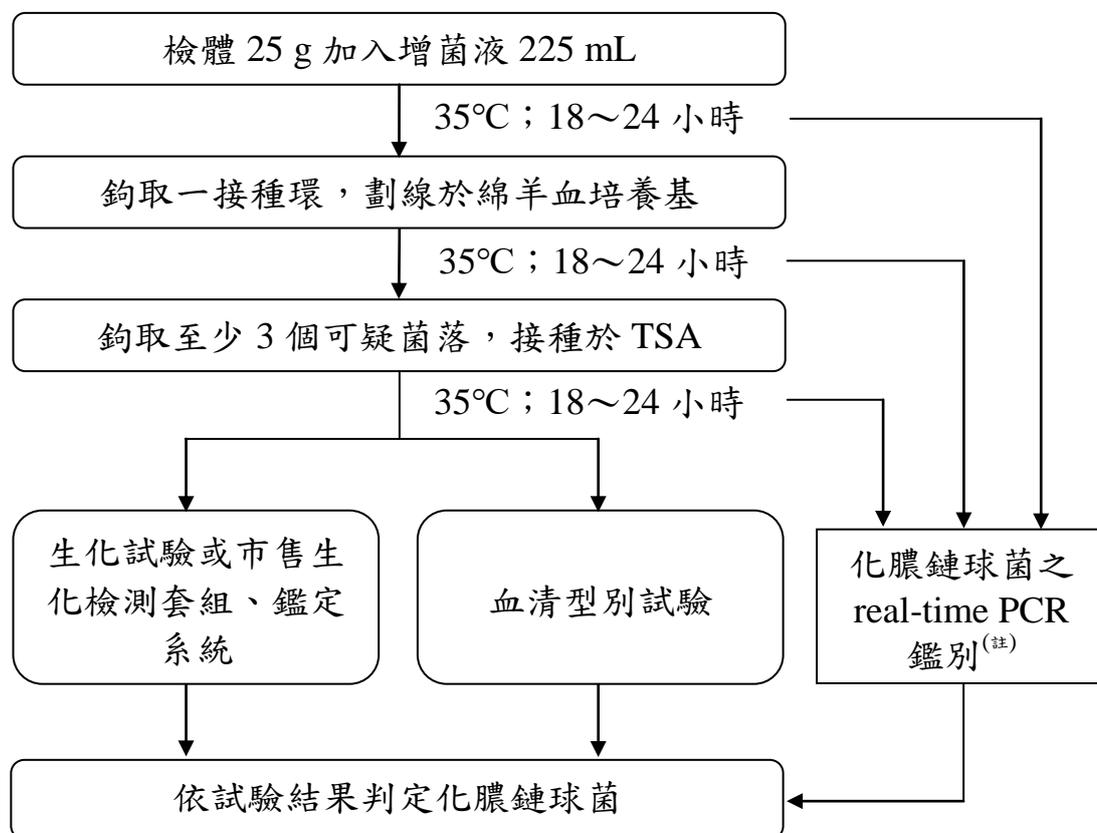
註5：本real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部化膿鏈球菌之real-time PCR檢驗可視需要執行。

參考文獻：

1. Spellerberg, B. and Brandt, C. 2003. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. pp.383-402. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
2. Kodani, M., Yang, G., Conklin, L. M., Travis, T. C., Whitney, C. G., Anderson, L. J., Schrag, S. J., Taylor, Jr., T. H., Beall, B. W., Breiman, R. F., Feikin, D. R., Njenga, M. K., Mayer, L. W., Oberste, M. S., Tondella, M. L. C., Winchell, J. M., Lindstrom, S. L., Erdman, D. D. and Fields, B. S. 2011. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2175-2182.

檢驗流程圖



註：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。