

食品微生物之檢驗方法—金黃色葡萄球菌之檢驗  
Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Staphylococcus aureus*

第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗

1. 適用範圍：本方法適用於食品中金黃色葡萄球菌及其腸毒素(enterotoxins)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養之方法。
  - 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。
    - 2.2.3. 高壓滅菌釜。
    - 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在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.7. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
    - 2.2.8. 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。
    - 2.2.9. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。
    - 2.2.10. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.11. 離心機：轉速可達3000 rpm以上。
    - 2.2.12. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 2.2.13. 加熱器。
    - 2.2.14. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
    - 2.2.15. 微量吸管尖(Tip)：10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.16. 吸管(Pipette)：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。
    - 2.2.17. 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。
    - 2.2.18. 稀釋用容器：無菌袋或有1000 mL、500 mL、99 mL及90 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
    - 2.2.19. 試管：10  $\times$  100 mm，13  $\times$  100 mm試管或其他適用者。
    - 2.2.20. 無菌濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$ 或以下之親水性濾膜。
    - 2.2.21. 無菌棉花棒或塗抹棒。

- 2.2.22. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.23. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.25. 曲玻棒：可滅菌者，直徑3~4 mm，塗抹區域45~55 mm。
- 2.2.26. 濾紙及褐色試藥瓶
- 2.2.27. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、無水磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、30%過氧化氫溶液、乙二胺四醋酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、結晶紫(crystal violet)、碘化鉀、草酸銨、碘、沙黃O (safranin O)、氫氧化鈉、磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、亞碲酸鉀(potassium tellurite)、葡萄糖(dextrose)、甘露糖醇(mannitol)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、液態石蠟油或礦物油、甘胺酸(glycine)、氯化鋰( $\text{LiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、酚紅(phenol red)、去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)、氯化鈣( $\text{CaCl}_2$ , anhydrous)、甲苯胺藍O (toluidine blue O)、三甲醇胺基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]及乙醇等均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、溶菌素(lysostaphin)、胰化蛋白胨(tryptone)、牛肉抽出物(beef extract)、酵母抽出物(yeast extract)、洋菜(agar)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)、月示蛋白胨(proteose peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)及凝固酶血漿(兔來源，經EDTA處理)等均採用微生物級。
- 2.2.28. 試劑
- 2.2.28.1. 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。
- 2.2.28.2. 1%亞碲酸鉀溶液：取亞碲酸鉀1 g溶於蒸餾水100 mL，稍加熱，使其完全溶解(當有白色不溶物存在，則表示此亞碲酸鉀粉末已不可使用)，溶液經無菌濾膜過濾，貯存於冰箱中備用，當有白色沉澱產生即不可使用，使用期限以不超過1個月為宜。
- 2.2.28.3. 含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液  
溶液A：取無水磷酸氫二鈉28.4 g及氯化鈉100 g溶於蒸餾水中，使成為1000 mL，混勻，備用。續取混合液50 mL，加蒸餾水使成500 mL，混勻，備用。

溶液B：取磷酸二氫鈉27.6 g及氯化鈉100 g溶於蒸餾水中，使成為1000 mL，混勻，備用。續取混合液10 mL加蒸餾水使成100 mL，混勻，備用。

將溶液B徐徐加至溶液A中，攪拌均勻，直至pH值為7.3～7.4，即為含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液。

2.2.28.4. 溶菌素溶液：取溶菌素2 mg溶於2.2.28.3.節之含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液40 mL，取適量分裝後，冷凍保存，使用期限以不超過3星期為宜。

2.2.28.5. 液態石蠟油或礦物油：

取液態石蠟油或礦物油20～50 mL，裝入有蓋容器中約1/2滿，以121℃滅菌30分鐘。

2.2.28.6. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)<sup>(註)</sup>

2.2.28.6.1. 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。

2.2.28.6.2. 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中，將此溶液注入褐色瓶中，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。

2.2.28.6.3. 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：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。

2.2.29. 稀釋液

2.2.29.1. 生理食鹽水：取氯化鈉8.5 g溶於蒸餾水1000 mL中，分裝於稀釋用容器中，經121℃滅菌15分鐘。

2.2.29.2. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：取磷酸二氫鉀34 g溶於蒸餾水500 mL中，以1 N氫氧化鈉溶液調pH值為7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121℃滅菌15分鐘，貯存於冰箱中，作為原液備用。使用時，取原液1.25 mL加入蒸餾水至1000 mL，分裝於

稀釋用容器中，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.29.3. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% peptone diluent)：取蛋白胨1 g溶於蒸餾水，使成為1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.1。

2.2.29.4. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)：取蛋白胨10 g，氯化鈉5 g，無水磷酸氫二鈉3.5 g，磷酸二氫鉀1.5 g溶於蒸餾水，使成為1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

## 2.2.30. 培養基

### 2.2.30.1. 巴德派克培養基(Baird-Parker medium, BP)

基礎培養基(basal medium)

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 胰化蛋白胨(tryptone).....               | 10 g   |
| 牛肉抽出物(beef extract).....           | 5 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract).....          | 1 g    |
| 丙酮酸鈉(sodium pyruvate).....         | 10 g   |
| 甘胺酸(glycine).....                  | 12 g   |
| 氯化鋰(LiCl · 6H <sub>2</sub> O)..... | 5 g    |
| 洋菜(agar).....                      | 20 g   |
| 蒸餾水.....                           | 950 mL |

加熱溶解後以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.2。

蛋黃亞碲酸鹽強化培養液(egg yolk tellurite enrichment, EYT)

蛋洗淨後，浸入70%乙醇溶液中1小時。以無菌操作，取出蛋黃加入無菌生理食鹽水，以體積3：7之比例混合攪拌均勻後，取50 mL加入經0.45 μm孔徑濾膜過濾之1%亞碲酸鉀溶液10 mL，混合均勻後貯存於冰箱中備用。

完全培養基(complete medium)

將基礎培養基冷卻至45~50°C時加入EYT，基礎培養基與EYT以體積為95：5之比例混合均勻。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15~20 mL，凝固後呈不透明，使用前應使表面乾燥。製備好之培養基置於20~25°C，使用期限以不超過5天為宜。

### 2.2.30.2. 腦心浸出物培養液(Brain heart infusion broth, BHI)

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 牛腦浸出物(calf brain infusion)..... | 200 g |
| 牛心浸出物(beef heart infusion)..... | 250 g |
| 胨蛋白胨(proteose peptone).....     | 10 g  |

氯化鈉..... 5 g  
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )..... 2.5 g  
葡萄糖(dextrose)..... 2 g  
蒸餾水..... 1000 mL  
加熱溶解後，分裝於試管中，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.4\pm 0.2$ 。

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

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone) .....15 g  
植物蛋白胨(phytone peptone)... .....5 g  
氯化鈉.....5 g  
洋菜(agar)..... 15 g  
蒸餾水..... 1000 mL  
平板培養基配製方法：攪拌加熱溶解後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.3\pm 0.2$ ，冷卻至 $50^\circ\text{C}$ ，每培養皿注入約20 mL，凝固後確定表面乾燥後使用；斜面培養基配製方法：加熱溶解後，分取約5 mL注入試管，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.3\pm 0.2$ 。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約4~5 cm，斜面底部之深度約2~3 cm。

2.2.30.4. 酚紅碳水化合物培養液(Phenol red carbohydrate broth)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)..... 10 g  
牛肉抽出物(beef extract)..... 1 g  
酚紅(phenol red)..... 0.018 g  
氯化鈉.....5 g  
蒸餾水..... 1000 mL  
取葡萄糖或甘露醇5 g加入上述之培養液中，加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 $118^\circ\text{C}$ 滅菌10分鐘後立即冷卻，最終pH值為 $7.4\pm 0.2$ 。

2.2.30.5. 甲苯胺藍去氧核糖核酸培養基 (Toluidine blue deoxyribonucleic acid agar, TDNA)

去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)..... 0.3 g  
氯化鈣( $\text{CaCl}_2$ , anhydrous)..... 1.1 mg  
氯化鈉.....10 g  
甲苯胺藍O (toluidine blue O)..... 0.083 g  
三甲醇胺基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]  
..... 6.1 g  
洋菜(agar)..... 10 g  
蒸餾水..... 1000 mL

先將三甲醇胺基甲烷溶解於蒸餾水1000 mL中，調整pH值至9.0後，加入甲苯胺藍O除外之其他成分，加熱使之完全溶解，再加入甲苯胺藍O，混合均勻，分裝於螺蓋試管中，貯存於冰箱中備用。置於室溫時，其貯存時間以不超過4個月為宜。使用前，先行加熱溶解，取3 mL滴於載玻片(76×26 mm)上，俟凝固後作成數個2 mm直徑之凹洞備用。

2.2.30.6. 胰化酪蛋白大豆培養液(含10%氯化鈉及1%丙酮酸鈉)(Trypticase soy broth (TSB) with 10% NaCl and 1% sodium pyruvate)

|                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| 胰化酪蛋白胨(trypticase peptone).....              | 17 g    |
| 植物蛋白胨(phytone peptone).....                  | 3 g     |
| 氯化鈉.....                                     | 100 g   |
| 磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )..... | 2.5 g   |
| 葡萄糖(dextrose).....                           | 2.5 g   |
| 丙酮酸鈉(sodium pyruvate).....                   | 10 g    |
| 蒸餾水.....                                     | 1000 mL |

加熱溶解後，取10 mL分裝於試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2。

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50 g，加入稀釋液450 mL，充分混合均勻，即為10倍稀釋檢液。

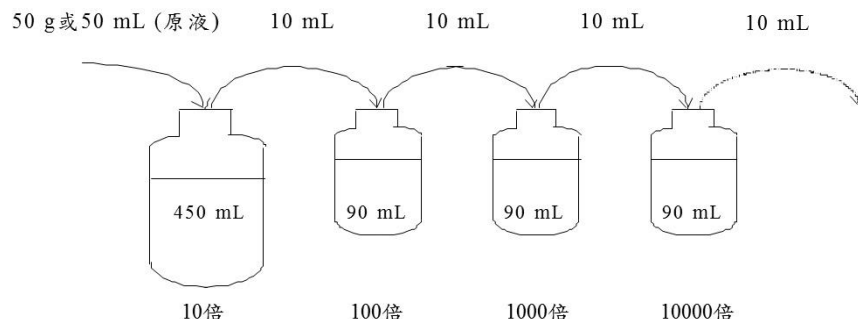
2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：可用已滅菌之藥勺或其他方便使用之用具加以粉碎後，混合均勻，取檢體50 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。

2.3.3. 液態檢體：可用振搖方式，使充分均勻混合，取檢體50 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、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如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，以幫助檢體之解凍。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、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依照2.3.1.節方法，製成10倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存在-20℃中。

2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經適當攪拌均勻後，取檢體50 g，以下步驟同2.3.1.節之操作。

2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL加至稀釋液90 mL中，依序作成一系列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



2.3.7. 塗抹物(Swab)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，添加蛋白腴緩衝液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，取溶出液供作檢液。

- 註：1. 除肉製品使用蛋白腴稀釋液外，其他檢體通常以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。
2. 檢體總量不足50 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。
3. 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1% Tween 80)，並充分振搖，使之乳化。

## 2.4. 鑑別試驗

### 2.4.1. 分離培養

#### 2.4.1.1. 直接平板法(Direct plate count method)

2.4.1.1.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分振搖，混合均勻。

2.4.1.1.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液0.1 mL分別置入BP培養基平板，每一檢液至少做二重複，共2個平板；預期檢體中含低菌量金黃色葡萄球菌時，可各吸取每一稀釋檢液及(或)原液1 mL，置入3個BP培養基平板(例如：0.3 mL、0.3 mL及0.4 mL)，每一檢液至少做二重複，共6個平板。

2.4.1.1.3. 以已滅菌塗抹曲棒均勻塗抹乾後，倒置於35°C培養45~48小時，觀察所形成菌落之生長狀態。菌落為圓形，直徑2~3 mm，表面凸起、平滑、具乳酪膠狀，呈

灰黑色或黑色，周邊色淡，菌落外圍依序由內而外，有不透明環及透明環環繞，則為可疑之金黃色葡萄球菌。

- 2.4.1.1.4. 選取含20~200個菌落之平板<sup>(註)</sup>，鉤取可疑菌落分別接種於1 mL BHI培養液，製成懸浮液，並同時接種於TSA斜面培養基，均以35°C培養18~24小時，供後續試驗使用。

註：1. 當可疑菌落只出現在大於200個菌落或小於20個菌落之平板時，則以出現可疑菌落之平板進行試驗。  
2. 當平板中含不同型態之可疑菌落時，則各型態之可疑菌落均應鉤取至少2個進行試驗。  
3. 必要時，平板之菌落應再行純化。

- 2.4.1.2. 最確數(Most Probable Number，簡稱MPN)計數法：預期檢體中只含低菌量金黃色葡萄球菌時使用。

2.4.1.2.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液分別充分混合均勻。

- 2.4.1.2.2. 分別吸取1 mL接種於已裝有10 mL之TSB培養液(含10%氯化鈉及1%丙酮酸鈉)試管中，每一檢液各接種3支(三階三支；為原液、10倍、100倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量1, 0.1, 0.01 (g或mL)；為10倍、100倍、1000倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量0.1, 0.01, 0.001(g或mL))，於35°C培養48±2小時。

註：接種之檢液應以最高稀釋倍數有負反應者才可用於計數。

- 2.4.1.2.3. 從2.4.1.2.2.節每一支呈混濁(細菌生長的現象)之TSB培養液試管中各取一接種環菌量，劃線於BP培養基，於35°C培養48小時。

- 2.4.1.2.4. 由每個有細菌生長的平板中至少鉤取一個可疑菌落，依照2.4.1.1.4.節，接種於BHI培養液及TSA斜面培養基，培養後供後續試驗使用。

## 2.4.2. 革蘭氏染色(Gram stain)：

- (1) 鉤取菌體：加適量無菌生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)自2.4.1.節之TSA斜面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，水洗。
- (4) 脫色：用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。

(5) 複染：用哈克氏複染液複染30秒，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。金黃色葡萄球菌為革蘭氏陽性，菌體呈單一成對或不規則之簇狀排列的球菌，不產芽孢。

2.4.3. 凝固酶試驗(Coagulase test)：吸取凝固酶血漿各0.5 mL，分別加至2.4.1節BHI增菌液0.2~0.3 mL中，於35°C培養6小時，每隔1小時觀察有無凝塊之形成，若無凝塊形成時，應繼續培養至24小時觀察之；有凝塊形成，應將試管緩緩傾斜或倒置，凝塊仍留在原處時，其凝固程度為4+，則可判定金黃色葡萄球菌為陽性。若有可疑或其凝固程度為3+, 2+, 1+時，則應繼續進行下列輔助試驗。

2.4.4. 輔助試驗(Ancillary tests)

2.4.4.1. 觸酶試驗(Catalase test)：自2.4.1.節之TSA斜面培養基上鉤菌，塗抹於載玻片上，加1~2滴3%過氧化氫溶液，觀察有無氣泡產生。產生氣泡者，為正反應；不產生氣泡者，為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

2.4.4.2. 溶菌素敏感性試驗(Lysostaphin sensitivity test)：自2.4.1.節之TSA斜面培養基上鉤菌，移植於裝有含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液0.2 mL之試管中，作成懸浮液(試管A)(呈混濁狀態)。從試管A中取懸浮液0.1 mL，置入另一試管(試管B)中，然後取溶菌素溶液0.1 mL加入試管A(最終濃度為25 µg/mL)，作為試驗組；同時，另取含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液0.1 mL加入試管B，作為對照組。將試管A及試管B於35°C放置2小時，放置期間隨時觀察，當A試管由混濁變成澄清者，為正反應；仍維持原混濁狀態者，為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

2.4.4.3. 厭氧下葡萄糖之利用(Anaerobic utilization of glucose)：自2.4.1.節之TSA斜面培養基上鉤菌，接種於酚紅葡萄糖培養液中，再徐徐加入已滅菌之液態石蠟油或礦物油至高度約2.5 cm，於37°C培養5天。培養液由紅色轉變成黃色者，為正反應；培養液顏色不變者，為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

2.4.4.4. 厭氧下甘露醇之利用(Anaerobic utilization of mannitol)：自2.4.1.節之TSA斜面培養基上鉤菌，接種於酚紅甘露糖醇培養液中，再徐徐加入已滅菌之液態石蠟油或礦物油至高

度約2.5 cm，於37℃培養5天。培養液由紅色轉變成黃色者，為正反應；培養液顏色不變者，為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

- 2.4.4.5. 熱安定型核酸分解酶試驗(Thermostable nuclease test)：取2.4.1節BHI增菌液置於沸水中加熱15分鐘後，冷卻後吸取約0.01 mL滴入TDNA之凹洞內後，置於含潮濕海綿之培養皿內，於35℃培養4小時，隨時觀察其顏色變化情形，凹洞旁之培養基由藍色變成粉紅色，環之寬度在1 mm以上者為正反應，否則為負反應。金黃色葡萄球菌為正反應。

## 2.5. 判定

- 2.5.1. 金黃色葡萄球菌陽性者，應符合下表所列之結果。

| 試 驗         | 正反應(+)                      | 負反應(-) | 金黃色葡萄球菌之反應 |
|-------------|-----------------------------|--------|------------|
| 革蘭氏染色       | 陽性、無芽孢之球菌，菌體呈單一、成對或不規則之簇狀排列 | 無左述現象  | +          |
| 凝固酶試驗       | 凝塊形成                        | 無凝塊形成  | +          |
| 觸酶試驗        | 氣泡產生                        | 無氣泡產生  | +          |
| 厭氧下葡萄糖利用試驗  | 黃色                          | 原色     | +          |
| 厭氧下甘露糖醇利用試驗 | 黃色                          | 原色     | +          |
| 溶菌素敏感性試驗    | 澄清                          | 混濁     | +          |
| 熱安定型核酸分解酶試驗 | 產生粉紅色環其寬度在1mm以上             | 原色     | +          |

「+」表示90%以上為正反應。

- 2.5.2. 由2.5.1.節判定為金黃色葡萄球菌陽性者，依2.6.節計數其菌數。

## 2.6. 計數

- 2.6.1. 直接平板法菌數之計算：

- 2.6.1.1. 選取每片含20~200個菌落之同一稀釋倍數之所有平板計數可疑菌落，鉤取可疑菌落至少2個進行試驗，依2.5.節判定計算出可疑菌落中含有金黃色葡萄球菌之比率(R，見下

公式)，再以2.6.1.2.或2.6.1.3.節公式計算出檢體中金黃色葡萄球菌數。具有不同型態之可疑菌落時，應分別計數、分別計算比率(R)、分別求得各型態之金黃色葡萄球菌數，再將之相加總，得到檢體中所有型態之金黃色葡萄球菌數。

$$\text{比率}(R) = \frac{N_1}{N_0}$$

$N_0$ ：進行試驗之可疑菌落數。

$N_1$ ：經試驗後判定為金黃色葡萄球菌之菌落數。

- 2.6.1.2. 各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數平板之菌落數為20～200時，應計數該稀釋倍數之所有平板(2個或6個)中可疑菌落數總和並依下列公式計算。其菌數之表示方式為CFU/g或CFU/mL，記錄菌數時應將第三位數字四捨五入，使其有效數字為兩位。

$$\text{金黃色葡萄球菌數(CFU/g或CFU/mL)} = (\sum a) \times \frac{A}{V_A} \times R$$

$\sum a$ ：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和。

$V_A$ ：A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積。

A：稀釋倍數。

R：比率。

- 2.6.1.3. 當有兩種稀釋倍數平板之菌落數在20～200之間時，先個別計算出各稀釋倍數之金黃色葡萄球菌數，再取其平均值，依下列公式計算。

$$\text{金黃色葡萄球菌數(CFU/g或CFU/mL)} =$$

$$\left[ (\sum a) \times \frac{A}{V_A} + (\sum b) \times \frac{B}{V_B} \right] \times \frac{R}{2}$$

$\sum a$ ：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和。

$\sum b$ ：B稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和。

$V_A$ ：A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積。

$V_B$ ：B稀釋倍數之所有平板中檢液總體積。

A、B：稀釋倍數。

R：比率。

- 2.6.2. 最確數計算：由2.5.節判定為金黃色葡萄球菌之各階試管數，利用接種量為每試管0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)之三階三支最確數表(如附表)，推算出金黃色葡萄球菌之最確數(MPN/g或

MPN/mL)。

附表：最確數表

| 正反應試管數 |      |       | 最確數<br>(MPN/g或<br>MPN/mL) | 95%<br>信賴界限 |     | 正反應試管數 |      |       | 最確數<br>(MPN/g或<br>MPN/mL) | 95%<br>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         | --   |

\*：各階試管中所含檢體量(g或mL)

說明：最確數表適用的接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

$$\text{最確數MPN/g (MPN/mL)} = \frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量} \times 10}$$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為3-1-0時，對照最確數表之最確數為43，

(1) 當接種量為各階試管含檢體1, 0.1, 0.01 (g或mL)，推算出測試

$$\text{菌之最確數} = \frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(2) 當接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，推算出

$$\text{測試菌之最確數} = \frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(3) 當接種量為各階試管含檢體0.01, 0.001, 0.0001 (g或mL)，推算

$$\text{出測試菌之最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

## 2.7. 腸毒素之檢驗

2.7.1. 金黃色葡萄球菌腸毒素：鉤取經2.5.節確認為金黃色葡萄球

菌之單一菌落，接種於BHI培養液，於35℃培養24小時後，培養液以3000 rpm轉速離心20分鐘，取上清液進行腸毒素檢驗。檢驗方式可逕自參考使用經確效認可之腸毒素檢測方法或市售套組。

2.7.2. 食品中金黃色葡萄球菌腸毒素：萃取方法依食品種類及檢測方式而異，可逕自參考使用經確效認可之腸毒素檢測方法或市售套組，依其建議及產品說明進行萃取及檢測。

2.8. 如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，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

## 第二部：金黃色葡萄球菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於金黃色葡萄球菌菌種及其A、 B、C、D、 E型腸毒素基因之鑑別。
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<sup>(註1)</sup>
    - 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。
    - 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(Micro refrigerated centrifuge)：可達20000 × g，並具4℃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. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20℃)功能。
    - 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
    - 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<sup>(註2)</sup>

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 金黃色葡萄球菌菌種鑑別基因(標的基因：*nuc*)

引子F：5'-AAATTACATAAAGAACCTGCGACA-3'

引子R：5'-GAATGTCATTGGTTGACCTTTGTA-3'

探針P：5'-(FAM)-AATTTAACCGTATCACCATCAAT  
CGCTTT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小64 bp

2.3.2.1.2. 金黃色葡萄球菌A型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entA*)

引子F：5'-TTTGGAACCGTTAAAACGAATAAG-3'

引子R：5'-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA-3'

探針P：5'-(FAM)-CTGTTTCAGGAGTTGGATC-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小80 bp

2.3.2.1.3. 金黃色葡萄球菌B型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entB*)

引子F：5'-AGGTGACTGCTCAAGAATTAGATTACC-3'

引子R：5'-AAGGCGAGTTGTTAAATTCATAGAGTT-3'

探針P：5'-(FAM)-AACTCGTCACTATTTGGTG-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小84 bp

2.3.2.1.4. 金黃色葡萄球菌C型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entC*)

引子F：5'-GGCGATAAGTTTGACCAATCTAAATAT-3'

引子R：5'-AAGGTGGACTTCTATCTTCACACTTTT-3'

探針P：5'-(FAM)-TGTACAACGACAATAAA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小90 bp

2.3.2.1.5. 金黃色葡萄球菌D型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entD*)

引子F：5'-CACAAGCAAGGCGCTATTTG-3'

引子R：5'-TCGGGAAAATCACCTTAACA-3'

探針P：5'-(FAM)-ATACAGCGCGGAAA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小151 bp

2.3.2.1.6. 金黃色葡萄球菌E型腸毒素鑑別基因(標的基因：*entE*)

引子F：5'-CTTTGGCGGTAAGGTGCAA-3'

引子R：5'-ACCGTGGACCCTTCAGAAGA-3'

探針P：5'-(FAM)-AGGCTTGATTGTGTTTCA-(MGB)-3'

### PCR增幅產物大小60 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℃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 (BHQ1)或Minor Groove Binder (MGB)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：金黃色葡萄球菌參考菌株、產毒型(產A、B、C、D、E型腸毒素)金黃色葡萄球菌參考菌株或其DNA。

### 2.4. 器具及材料<sup>(註3)</sup>

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

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：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<sup>(註4)</sup>

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2.3.1.節於35°C培養18~24小時之檢液中吸取菌液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

自培養基上鈎取一接種環的菌量，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.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗<sup>(註5)</sup>

### 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入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. 金黃色葡萄球菌菌種鑑別基因及其A、B、C、D、E型腸毒素鑑別基因反應條件

| 步驟                  | 溫度(°C) | 時間(sec) |
|---------------------|--------|---------|
| 1. 熱活化              | 95     | 20      |
| 2. 最初變性             | 95     | 15      |
| 3. 黏接、延展            | 60     | 30      |
| 步驟2至步驟3，共進行45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與金黃色葡萄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金黃色葡萄球菌或其A、B、C、D、E型腸毒素基因。

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。

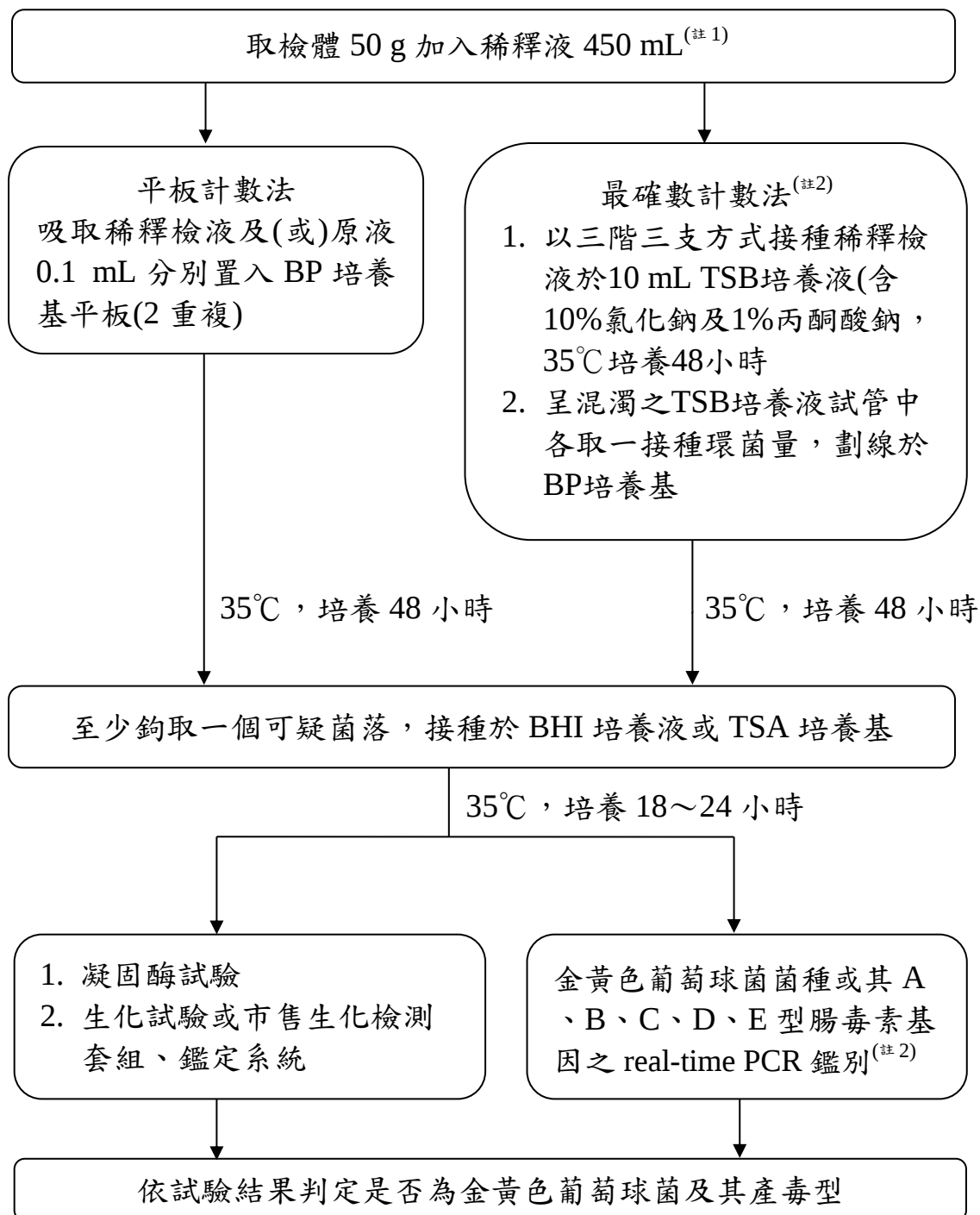
附註：第二部金黃色葡萄球菌之real-time PCR檢驗可視需要執行。

參考文獻：

1. Bennett, R. W. and Lancette, G. A. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 12 *Staphylococcus aureus*. US FDA.

2. Fosheim, G. E., Nicholson, A. C., Albrecht, V. S. and Limbago, B. M. 2011. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and associated toxin genes. J. Clin. Microbiol. 49(8): 3071-3073.
3. Nakayama, A., Okayama, A., Hashida, M., Yamamoto, Y., Takebe, H., Ohnaka, T., Tanaka, T. and Imai, S. 2006. Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. J. Med. Microbiol. 55: 273-277.

## 檢驗流程圖



註 1：除肉製品使用蛋白胨稀釋液外，其他檢體通常以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。

註 2：最確數(Most Probable Number，簡稱 MPN)計數法：預期檢體中只含低菌量金黃色葡萄球菌時使用。

註 3：可依檢體含菌量情況自行探討接續之 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。