

以逆被動乳膠凝集方法偵測食品中 產毒金黃色葡萄球菌及腸毒素

柯錫津 *張翠瑛

行政院衛生署藥物食品檢驗局 *國立清華大學生命科學院

摘 要

由市售食品(奶製品46件、肉製品76件及米製品74件,共計196件)及縣市衛生局送驗之食品中毒檢體(共計169件)中分離出之金黃色葡萄球菌,以逆被動乳膠凝集法(reversed passive latex agglutination, RPLA)測試產毒性及型別。市售食品金黃色葡萄球菌檢出率為16% (32/196)。以RPLA檢測具有產毒能力之菌株為56% (18/32),而毒素型別以A型最多(50%, 9/18)。食品中毒檢體中金黃色葡萄球菌之檢出率為32% (54/169),同樣以RPLA檢測,菌株具產毒能力者占78% (42/54),毒素型別亦以A型最多(81%, 34/42)。另對火腿、壽司、奶粉等食品分別以2.5、5、10及20 ng/g之腸毒素A (SEA)添加,探討最低檢出量(detection limit)。並以添加10、20及40 ng/g之SEA濃度,進行回收試驗。壽司及奶粉製品之最低檢出量可達5 ng/g,但SEA濃度若介於10-40 ng/g則回收率較佳。

前 言

葡萄球菌食品中毒(staphylococcal food poisoning)^(1,2)主要係由於食品污染金黃色葡萄球菌,增殖之結果,產生有毒代謝產物—腸毒素(enterotoxins)所引起,潛伏期為0.5~8小時,中毒症狀有噁心、嘔吐、下痢、腹痛等情形。依據行政院衛生署『81年台灣地區食品中毒發生狀況』⁽³⁾之統計資料顯示,金黃色葡萄球菌所造成之食品中毒比率已從民國76年之13%上升至民國81年之32.7%,佔細菌性食品中毒的第一位。金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)廣泛存在於人類或動物的皮膚、口腔、鼻腔和傷口等處,其中尤其是傷口、膿瘡所存在的金黃色葡萄球菌是污染食品的來源。金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)會產生一種或多種熱原性外毒素群(pyogenic exotoxins),包括葡萄球菌腸毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)、毒休克型毒素1(toxic shock syndrome toxin 1,

TSST-1)和剝落毒素A及B (exfoliative toxins A and B)⁽⁴⁾。腸毒素依血清型又可分A、B、C、D、E等五種類型,C型又可細分為C₁、C₂、C₃三型。腸毒素為一群分子量介於26,000-34,000之蛋白質分子,可抗高溫及多種蛋白質分解酵素。其中以A型之出現頻率最高(約50%),其它依序為D型(常與A型相伴而生),C型、B型、E型。而TSST-1則是由分離自毒休克型患者之金黃色葡萄球菌所產生的,由於此毒素類似腸毒素之蛋白質,有時被稱為F型葡萄球菌腸毒素,但TSST-1並不表現葡萄球菌腸毒素(SEs)的性質^(5,6)。

因為葡萄球菌食品中毒屬於毒素型細菌性食品中毒,所以產毒菌株之分離與鑑定,應是葡萄球菌食品中毒的指標。目前,已知會產生腸毒素之金黃色葡萄球菌,約佔金黃色葡萄球菌之50%左右⁽¹⁾。但由現行食品衛生法規中,規定一般食品不得檢出病原菌如金黃色葡萄球菌,並未明確規定自食品中直接偵測腸毒素。引起中毒案的食品檢體僅檢驗檢體中之活菌,祇要每公克檢出10⁵ CFU以上的

金黃色葡萄球菌^(2,7),即可判定為該菌所造成之中毒原因。但是金黃色葡萄球菌,其菌體對熱很敏感,而其腸毒素對熱則具有抵抗性,於100°C加熱30分鐘,仍不完全被破壞⁽¹⁾。所以易發生該菌雖已死亡,但仍殘留毒素於食品中。

目前有關葡萄球菌腸毒素之檢測方法,除了美國FDA的凝膠擴散法(gel diffusion method)外,尚有酵素連接免疫吸附法(ELISA)、放射性免疫分析法(RIA)、逆被動紅血球凝集反應方法(RPHA)、逆被動乳膠凝集反應方法(RPLA)等多種方法⁽⁸⁻¹¹⁾。其中RPLA由於操作簡便、敏感度高、所需儀器設備少,故適合於例行的檢驗工作。本研究選擇肉製品、米飯製品及乳製品等食品,故適合於例行的檢驗工作。本研究選擇肉製品、米飯製品及乳製品等食品,以RPLA方法進行金黃色葡萄球菌之產毒菌株及毒素型別分析探討,進而瞭解台灣地區由金黃色葡萄球菌引起食品中毒其毒素型別之狀況及是否與流行趨勢有關,冀供日後食品中毒案判定之參考。

材料與方法

一、材料

(一)檢體來源:民國79年9月至80年6月從全省傳統市場、零售商店、各超級市場,抽購肉製品76件、米飯製品74件、奶製品46件共計196件;民國79年7月至80年6月由各縣市衛生局送本局檢驗食品中毒案共計169件。

(二)試劑:腸毒素A (SEA)標準品,購自Toxin technology (Wisconsin, U.S.A.),氯仿、氯化鈉、磷酸二氫鈉、無水磷酸氫二鈉等均採用化學試藥級製品。

(三)培養基:巴德派克培養基(Baird-Parker medium, BP),腦心浸出培養基(Brain Heart Infusion broth, BHI),胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase Soy Agar, TSA)及凝固酶血漿(Coagulase plasma)購自Difco laboratories (Detroit, MI., U.S.A.)。

(四)使用SET-RPLA套組檢測金黃色葡萄球菌腸毒素之型別:

Staphylococcal enterotoxin A、B、C、D detection kit by reversed passive latex agglutination (Denka seiken co. LTD., Tokyo, Japan)。

二、方法

(一)金黃色葡萄球菌之計數、分離及鑑定:

依照中國國家標準CNS 12542, N6214金黃色葡萄球菌檢驗方法⁽¹²⁾進行檢驗,即精確稱取檢體50 g,加450 ml已滅菌之生理食鹽水(0.85%),用攪拌均質器(Stomacher: Lab-Blender 400, Seward Laboratory, London)拍打約2分鐘,作成10倍稀釋檢液各稀釋檢液及原液充分振搖、混勻後,每一稀釋檢液吸取0.3、0.3及0.4 ml(未經增殖)分別加在BP培養基之表面(二重覆),再以塗抹棒均勻塗抹,靜置乾後,倒置於35°C培養箱中,培養45-48小時,挑取可疑菌落以革蘭氏染色器(Slide Stainer: Boeckel industries, Inc., phila., PA. U.S.A.)進行革蘭氏染色,凝固酶試驗,同時以微生物全自動鑑定儀AMS Vitek Jr. (McDonnell Douglas, Mo, U.S.A.)予以鑑定菌株種類,最後並予計數,並將分離純化之金黃色葡萄球菌移植於TSA培養基中。

(二)腸毒素型別之測定⁽¹³⁾:

1. 從培養在TSA之菌株,接種至BHI broth中,35-37°C培養18小時,以J2-21 M/E離心機(Beckman instruments, Inc., CA. U.S.A.)經3000 rpm離心20分鐘,取上清液作為檢液。

2. 分別取25 μ l腸毒素對照標準液(陽性對照組)及以微量吸管連續吸取前述檢液25 μ l滴入微量盤(V-type)之4系列孔洞中,再各別加入25 μ l SET-RPLA (A、B、C、D)之感受性試劑(latex sensitized with anti-enterotoxin)與之作用,並各取套組所附25 μ l之未感受性試劑(陰性對照組)與25 μ l腸毒素對照標準溶液作用,置室溫下18小時後觀察,當V型盤底中心部有粉紅點沈降為負反應,反之則為正反應。

(三)食品中金黃色葡萄球菌腸毒素A (SEA)之測定:

1. 腸毒素A (SEA)標準品1 mg/vial以蒸餾水溶解稀釋配置成1 μ g/ml濃度之標準溶液。

2. 腸毒素之定量:

以SET-RPLA所附之稀釋液,確取25 μ l置入微量V型孔洞中,分別加入25 μ l檢液及標準液,做一系列2倍稀釋,再分別滴入25 μ l感受性試劑(latex sensitized with anti-enterotoxin A)與之作用。置室溫18小時後觀察,得到檢體液及標準液顯示凝集之最高稀釋倍數,依serologic techniques之hemagglutination方法⁽¹⁴⁾,將兩者相除,乘以標準品濃度,即求得該檢液之毒素濃度。

3. 萃取方法:第一種方法係取檢體10 g加90ml生理食鹽水,作成1:10倍,均勻振盪10分鐘,再以12,000 rpm於4°C高速離心20分鐘,取上層液進行腸毒素分析⁽¹³⁾。第二種方法係取檢體10 g,加40

ml生理食鹽水,作成1:5倍,均勻振盪10分鐘,再以12,000 rpm於4°C高速離心20分鐘,取上層液進行腸毒素分析。第三種方法係取檢體20 g,加40 ml 0.2 M NaCl水溶液,作成1:3倍,均勻振盪10分鐘,以1 N NaOH or HCl調節pH值為7.5,再以12,000 rpm於4°C高速離心,取上層液至分液漏斗中,加等量的氯仿振盪2分鐘,再置入耐氯仿之離心瓶,經12,000 rpm於4°C下離心15分鐘,取上層液進行腸毒素分析^(11,15)。

以上三種方法在均勻振盪10分鐘前,均添加腸毒素A,使其濃度成為2.5、5、10、20 ng/g及10、20、40 ng/g二組檢液,每一添加量分別作二重覆供最低檢出量試驗及作三重覆(置於4°C 30分鐘)供回收試驗,並各自做空白試驗。

結果與討論

一、市售食品與食品中毒案中分離出之金黃色葡萄球菌及該菌是否具產毒性之檢出情形

本次所抽購之196件檢體中,有32件可檢出金黃色葡萄球菌(表一),檢出率為16% (32/196)。其中肉製品之檢出率為25%,米飯製品為16%,乳製品為2%。以RPLA檢測菌株產毒能力時,有18件(56%)檢體可分離到產毒性金黃色葡萄球菌,而毒素型別以A型最多(50%, 9/18), B型次之(22%, 4/18),有些菌株同時檢出腸毒素A & B或B & D型。由食品中毒檢體中,有54件可檢出金黃色葡萄球菌,檢出率為32% (54/169)。同樣以RPLA檢測菌株產毒能力,有42件(78%)檢體可分離到產毒性金黃色葡萄球菌,而毒素型別仍以A型最多(81%, 34

/42),同時亦能檢出腸毒素A & B或A & D型之菌株(表一)。目前依食品衛生標準,僅規定金黃色葡萄球菌不得檢出,當然站在維護消費者而立法從嚴,理應如此,惟金黃色葡萄球菌之分佈範圍很廣,所以污染食品之機率很高,況且真正引起食品中毒原因,應是葡萄球菌腸毒素所造成的,因此增訂腸毒素應不得檢出乃屬必要。

由表二,金黃色葡萄球菌數低於100 CFU/g,一般市售樣品檢出產毒性菌株比率為80% (10株之中有8株)。在菌數高於10⁵ CFU/g的中毒檢體中,產毒性菌株之比率為82% (32/39),兩者並無明顯差異,一般而言,食品中檢出金黃色葡萄球菌是否具有產腸毒素能力,除了該菌需帶有毒素基因外,食品種類、不同環境⁽¹⁾(如溫度、pH、水活性、培養基及競爭性細菌的存在)和產不同型別毒素之菌株,均將影響到產毒能力,因此食品中若污染能產毒之金黃色葡萄球菌,即使菌數不高,在不當的保存環境之下仍有產生腸毒素的可能,而引發食品中毒。

二、直接自食品中測定金黃色葡萄球菌腸毒素A (SEA)之情形

(一)最低檢出限量的探討

對火腿、壽司、奶粉三種檢體,分別添加標準腸毒素A (SEA)後,以上述三種方法分別萃取,經以RPLA方法測得結果(表三),SEA在食品中的最低檢出濃度,顯然係隨食品種類而異。在火腿為20 ng/g,壽司及奶粉為10 ng/g。但是如果改變萃取方法,則壽司及奶粉的最低檢出濃度,可提高到5 ng/g,此與Wieneke⁽¹⁶⁾以火腿、肉類食品進行SEA最低檢出量測試結果可達4-20 ppb (ng/g)及Rose等⁽¹⁷⁾

Table 1. Isolation of *S. aureus* from foods and its production of enterotoxins

Source of sample	No. of sample	<i>S. aureus</i>	SE-producing strains	Type of enterotoxin							
		No. of positive sample (%)	No. of positive sample (%)	A	B	C	D	A&B	B&D	A&C	A&D
Meat products	76	19(25)	8(42)	3	1	0	1	2	1	0	0
Cooked rice products	74	12(16)	9(75)	5	3	1	0	0	0	0	0
Diary products	46	1(2)	1(100)	1	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal ^a	196	32(16)	18(56)	9	4	1	1	2	1	0	0
Food poisoning outbreaks ^b	169	54(32)	42(78)	34	1	2	0	1	0	0	4

^a purchased from September 1990 to June 1991 in Taiwan area

^b collected from local health bureaus from July 1990 to June 1991

Table 2. Contamination levels of *S. aureus* in different food types and the rate of enterotoxigenic strains

Source of sample	contamination levels of <i>S. aureus</i> (CFU/g)					
	<10 ²	<2.5×10 ²	<5.0×10 ²	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁵
	enterotoxigenic isolates/total isolates (%)					
Cooked rice products	3/4 (75)	1/2 (50)	4/5 (80)	0	0	0 1/1 (100)
Meat products	4/5 (80)	0/1 (0)	2/3 (67)	0	1/4 (25)	1/3 (33) 0/3 (0)
Dairy products	1/1 (100)	0	0	0	0	0
Food poisoning outbreaks	0	0/1 (0)	2/2 (100)	1/1 (100)	6/6 (100)	1/5 (20) 32/39 (82)

Table 3. Detection limit of staphylococcal enterotoxin A in a variety of foods as determined by RPLA

Extraction method	Food	SEA (ng/g)				
		0	2.5	5	10	20
10 g sample+90 ml 0.85% saline	ham	— ^a	—	—	—	+ ^b
	su-shi	—	—	±	+	+
	milk powder	—	±	±	+	+
10 g sample+40 ml 0.85% saline	ham	—	—	—	±	+
	su-shi	—	±	+	+	+
	milk powder	—	±	+	+	+
20 g sample+40 ml 0.2M NaCl defatted with chlorofom	ham	—	—	—	±	+
	su-shi	—	±	+	+	+

^a “—”: negative reaction

^b “+”: positive reaction

人以奶製品進行測試亦達5-10 ppb (ng/g)相近。因此以RPLA方法檢測食品中金黃色葡萄球菌腸毒素,由表三得知以1:5生理食鹽水萃取,或以1:3 0.2 M NaCl萃取再以氯仿脫脂則靈敏度會提高。

(二)回收測試的探討

以腸毒素A標準溶液分別添加於上述三種食品中,並依前述方法萃取處理,經以RPLA方法測試,由表四可知回收結果,在食品用生理食鹽水1:10萃取時,壽司及奶粉在10 ng/g腸毒素A下平均可達100%。火腿食品在20 ng/g腸毒素A則為68%,而在40 ng/g濃度下為83%,如再以氯仿脫脂處理可達100%以上,但若腸毒素A在食品中之濃度低,則測試結果不理想。此即意味著在進行例行食品中腸毒素檢驗時,若食品油脂性較高,應考慮以加氯仿去脂肪方法萃取較佳,而在一般脂肪性不高食品,

則使用第一、二種方法萃取測試即可,同時檢體所含的腸毒素濃度若介於10-40 ng/g,應比較不會影響測試結果。另外在進行RPLA試驗時,一定要盡量使檢液澄清,以去除一些干擾的凝集因子,否則易造成非特異性(non-specific)反應。本次實驗進行中,以4°C 12,000 rpm高速離心,所以未有混濁現象,不過RPLA主要是依據免疫學上抗原(antigen)和抗體(antibody)之結合反應,計量之方法係以hemagglutination方式計算其終點力價(end point titer)以求得,另外在食品中難免存在有某種干擾物質,如分子構造上類似之蛋白質或其它不明物質,可能會產生偽陽性,而造成定性、定量上的干擾。嚴格地說,RPLA法只能算是半定量法,不過我們仍將不斷地針對相關檢測方法,進一步檢討研究,以期能夠得到更理想的靈敏度及更合適的測量

Table 4. Effect of different food samples on the recoveries^a of enterotoxin A

Extraction method	Food	SEA (ng/g)		
		10	20	40
10 g sample + 90 ml 0.85% saline	ham	0% ^b	68%	83%
	su-shi	100%	125%	63%
	milk powder	100%	63%	NT ^c
10 g sample + 40 ml 0.85% saline	ham	0%	75%	75%
	su-shi	100%	150%	75%
	milk powder	125%	100%	NT
20 g sample + 40 ml 0.2 M NaCl defatted with chloroform	ham	0%	113%	90%
	su-shi	114%	91%	56%

^a average of three determinations

^b negative reaction

^c not tested

方法。但由於RPLA法操作簡便，所需設備少，故仍不失為目前用於測定腸毒素可行方法之一。

結 論

由一般食品或食品中毒檢體中所分離之金黃色葡萄球菌，有相當高之百分率具有產腸毒素之能力，故不要因為菌數少就忽視其潛在引發中毒之危險性，因此要避免造成食品衛生安全問題，應謹守『清潔、迅速、加熱與冷藏』等三原則。若懷疑食品中毒是由金黃色葡萄球菌所引起時，原則上，應直接測定食品中之腸毒素較為合理。此外，使用SET-RPLA (Denka Seiken, Tokyo)套組，目前只能測出A、B、C、D、E中的A、B、C及D四型腸毒素，因SEA與SEE型腸毒素其核苷酸序列(nucleotide sequence)有84%⁽¹⁸⁾之相似度(homology)，且抗原基(epitopes)相同⁽¹⁹⁾，故利用RPLA套組目前無法區分SEA及SEE，很有可能造成腸毒素A (SEA)檢出偏高情形，今後針對腸毒素將朝著利用聚合酶連鎖反應(PCR)或洪等⁽²⁰⁾人評估過之酵素免疫法(ELISA)技術做一比較研究，期能使金黃色葡萄球菌腸毒素之檢測方法更臻完善。

謝 誌

本文研究期間承蒙蔡韶慧小姐在採樣、試驗上之協助及古美華小姐之協助繕打，謹此致謝。

參考文獻

1. Bergdoll, M. S. 1989. Chapt. 11 *Staphylococcus aureus*. In “Foodborne Bacterial Pathogens”. pp. 463-523. Michael, P. D. (ed). New York: Marcel Dekker Inc. U.S.A.
2. 曾信雄. 1983. 細菌性食物中毒. pp. 19-23. 行政院衛生署藥物食品檢驗局. 台北.
3. 行政院衛生署. 1993. 民國81年台灣地區食品中毒發生狀況. pp. 4-11. 行政院衛生署. 台北.
4. Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. 1987. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C₁ gene and relatedness to other pyrogenic toxins. Mol. Gen. Genet. 209 : 15-20.
5. Melconian, A. K., Fleurette, J. and Brun, Y. 1985. Studies on staphylococci from toxic shock syndrome in France 1981-1983, J. Hyg. Camb. 94 : 23-29.
6. Bergdoll, M. S., Crass, B. A., Reiser, R. F., Robbins, R. N. and Davis, J. P. 1981. A new staphylococcal enterotoxin. The Lancet 1: 1017-1021.
7. 曾信雄. 1988. 產腸毒素金黃色葡萄球菌之完全檢測與影響其增殖與產毒之因子. 藥物食品檢驗局調查研究年報. 6 : 10-21.
8. Bennett, R. W. 1984. In “Bacteriological analytical manual”. 6th ed., pp. 15.01-15.11 U.S.

- Food and Drug Administration, U.S.A.
9. Wieneke, A. A., and Gilbert, R. J. 1987. Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in food from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 4 : 135-143.
 10. Fujikawa, H. and Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2345-2348.
 11. Freed, R. C., Evenson, M. L., Reiser, R. F. and Bergdoll, M. S., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 1349-1355.
 12. 經濟部中央標準局. 1986. 食品微生物之檢驗法—金黃色葡萄球菌之檢驗. 中國國家標準. 12542. N6214. 台北.
 13. Staphylococcal enterotoxin A, B, C, and D detection kit by reversed passive latex agglutination. *Biological Specialities*. pp. 38-40. Denka Seiken Co., LTD. Tokyo. Japan.
 14. Rovozzo, G. C. and Burke, C. N. 1973. A manual of virological techniques. pp. 94-103. Prentice-Hall, Inc., N.J. U.S.A.
 15. Bennett, R. W. and McClure, F. 1980. Extraction and separation of staphylococcal enterotoxin in foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 : 1205-1210.
 16. Wieneke, A. A. 1988. The detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by strains of *Staphylococcus aureus* with commercial RPLA Kits. *Int. J. Food Microbiol.* 7 : 25-30.
 17. Rose, S.A., Bankes, P. and Stringer, M. F. 1989. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) Kit. *Int. J. Food Microbiol.* 8 : 65-72.
 18. Couch, J. L., Soltis, M. T. and Betley, M. J. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170 : 2594-2960.
 19. Tsen, H. Y., Yang, R. Y. and Huang, F. Y. 1993. Novel oligonucleotide probes for identification of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *J. Ferment. Bioeng.* 76 : 7-13.
 20. 洪淑慎, 張翠瑛, 柯錫津. 1993. 利用酵素免疫法檢測金黃色葡萄球菌腸毒素之評估. *食品科學*. 20 : 394-401.

Using Reversed Passive Latex Agglutination Method to Detect Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Enterotoxin in Foods

HSI-CHIN KO AND *TSUI-YING CHANG

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan
161-2, Kuen Yang Street, Nan kang, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

**College of Life Science, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

A total of 196 food samples including rice products, meat products and dairy products, and 169 food poisoning samples collected from local health bureaus were examined for *Staphylococcus aureus*. In addition, the enterotoxins produced by the isolates were determined using reversed passive latex agglutination (SET-RPLA). *S. aureus* was found in 16% (32/196) of food samples from markets and in 32% (54/169) of

food poisoning samples. Furthermore, the most frequently found staphylococcal enterotoxin was type A which was detected in 50% (9/18) of the isolates from market food and in 81% (34/42) of the isolates from food poisoning samples. Enterotoxin A as low as 5 ng/g could be detected in rice and dairy products, and the recovery was better if SEA was present in foods at a concentration between 10-40ng/g.

Key Words : SET-RPLA, Staphylococcal enterotoxins, *Staphylococcus aureus*, Food poisoning.

