

應用聚合酶鏈反應於數種不同食品中腸毒素型 金黃色葡萄球菌之檢測

曾浩洋 *陳桐榮 虞積凱

國立中興大學 食品科學系

*國立嘉義農業專科學校 食品加工科

摘 要

本研究係利用金黃色葡萄球菌各型腸毒素基因檢測用PCR引子,於不同食品中腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測,結果發現,食品中污染之其他細菌,以及食品之組成分,並不干擾PCR檢測之特異性。PCR檢測靈敏度之探討,則發現在PCR循環數為35時,每毫升菌液含10 CFU以內之目標菌,或每克食品含100 CFU以內之目標菌可被檢測出;但PCR循環數降為25時,則每毫升所需菌數增加為 10^4 CFU以內。因此,若在適當的PCR循環數下,配合將目標菌短時間增殖,再予以稀釋之觀念,由於活菌可以增殖,死菌則否,PCR方法將有區別死菌及活菌之可能。

前 言

金黃色葡萄球菌分佈範圍廣泛,易引起食物中毒;在國內或國外其他國家,均是重要的食物中毒菌之一^(1,2)。以傳統方法檢測金黃色葡萄球菌,通常需要4天以上始可完成⁽³⁾,且無法區分產毒菌株與非產毒菌株。目前所開發的血清學方法應用於食品中金黃色葡萄球菌腸毒素的檢驗工作,雖可瞭解食品中是否含金黃色葡萄球菌的存在,但此類檢測方法尚有一些缺點,例如市售之SET-RPLA套組(Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D, Reverse passive latex agglutination kit, Denka Seiken, Tokyo, Japan)缺乏抗腸毒素E的抗體;又如以TE-CRA公司之葡萄球菌腸毒素酵素免疫分析套組(Staphylococcal enterotoxin visual immunoassay kit, bioenterprise pty. Ltd, Roseville, New South Wales, Australia)檢測食品中之葡萄球菌腸毒素時,非葡萄球菌屬細菌,如*Pseudomonas* spp., *Serratia* spp.等,會產生假性正反應^(4,5)。此外,免疫分析之檢測方法對不同腸毒素濃度之檢測敏感度問

題也需注意,例如:檢測結果常因葡萄球菌腸毒素濃度太低,例如受傷菌的產毒量低⁽²⁾,而致檢測不出,其實仍有產毒菌株的存在,以致仍有引起食物中毒的危險。因此,直接檢測腸毒素金黃色葡萄球菌的腸毒素基因的方法,如DNA雜交方法及聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR),具有確認腸毒素菌株以及檢測腸毒素可能產生的潛力,在食品衛生上,具有其重要性。

以金黃色葡萄球菌的PCR檢測而言,Wilson等人⁽⁶⁾曾發展PCR方法,以檢測具腸毒素型B,C及耐熱性核酸分解酶基因(thermonuclease gene, nuc)之金黃色葡萄球菌,並應用於牛乳中B, C,型腸毒素金黃色葡萄球菌之檢測。Johnson等人⁽⁷⁾亦曾完成檢測所有腸毒素型金黃色葡萄球菌腸毒素基因之PCR方法;本研究室最近亦曾發展出適合A,D及E型腸毒素以及B, C型腸毒素金黃色葡萄球菌檢測用之聚合酶鏈反應之PCR引子^(8,9),這些引子與上述諸人使用之PCR引子,其DNA序列並不相同,而A, D, E型腸毒素基因檢測用之PCR引子;初步用於牛肉中腸毒素型葡萄球菌之檢測,亦為可行,除上述外,有關應用PCR方法檢測其他不

同食品中腸毒素型金黃色葡萄球菌的報告則相當少。本研究因此擬探討以本研究室自行發展之PCR引子對多種不同食品,包括豬肉,雞肉,鴨肉,魚肉及香腸,牛乳,乳酪等食品中不同腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測可行性,藉以瞭解我們所發展的PCR方法,在食品中腸毒素型金黃色葡萄球菌檢測的廣泛應用性。

材料與方法

一、材料

(一)菌株

標準金黃色葡萄球菌菌株,包括可產生A, B, C, D, E型腸毒素(*Staphylococcal enterotoxin*) A, B, C, D, E即SEA, SEB, SEC, SED及SEE等菌株;其菌株來源為SEA (ATCC 13565), SEB (ATCC 14458), SEC (ATCC 19059), SED (ATCC 23235)及SEE (ATCC 27664)。

(二)培養基及藥品

Tryptic soy agar (TSA), Baird Parker base (BP), Egg yolk tellurite (EYT), Brain heart infusion (BHI), Phenol red carbohydrate broth; toluidine blue deoxyribonucleic acid agar (TDNA), Plate count agar (PCA), Luria broth (LB), Nutrient broth (NB)及Peptone等均購自美國Difco公司(Difco, Detroit, Mich., USA)。金黃色葡萄球菌毒素鑑定用套組-*Staphylococcal enterotoxin*-Reverse passive latex agglutination (SET-RPLA) kit, 購自Denka Seiken (Tokyo, Japan)。Lysozyme, ethidium bromide, lysostaphin, SDS (Sodium dodecyl sulphate), Tris (Tris-hydroxymethyl aminomethane)則購自Sigma (St. Louis Mo., USA) USA; Agarose 購自Pharmacia (Uppsala, Sweden); Proteinase K, dATP, dGTP, dTTP及dCTP購自西德Boehringer Mannheim biochemica (Mannheim, W. Germany); 限制酶Hind III, Hae III, Lambda DNA Φ X 174 RF DNA購自BioLabs (New England, Beverly, Mass., USA); Taq DNA Polymerase購自Promega公司(Madison, Wisc., USA); 其他藥品均為試藥一級以上純度。

(三)寡核苷酸引子(Oligonucleotide primers)

金黃色葡萄球菌腸毒素A, B, C, D, E基因檢測用PCR引子,其核酸序列如表一所示。

二、方法

(一)菌種培養及菌數測定

金黃色葡萄球菌培養於TSA斜面,保存於4°C。使用時則取一白金耳菌量接入5 ml的TSB或BHI培養液中經37°C, 12小時培養。菌數之計算則將菌液塗抹於TSA培養基上,經37°C, 24小時培養,計算其菌落形成數(colony forming unit, cfu)。

(二)金黃色葡萄球菌傳統檢驗法

依Bacteriological Analytical Manual (BAM)方法⁽¹⁰⁾所述行之。

(三)金黃色葡萄球菌腸毒素型檢測

依Denka Seiken公司之SET-RPLA檢測套組說明書行之,其可檢測之腸毒素型為A, B, C, D型四種。樣品前處理則如下所述:稱10克食品與90 ml生理食鹽水在Waring blender高速下均質1分鐘後,經3000 rpm離心20分鐘,吸取上清液供測試。若為菌株腸毒素型鑑定,則挑取一白金耳金黃色葡萄球菌接種於5 ml之BHI broth, 37°C培養10-12小時,經3000 rpm離心20分鐘,取上清液供測試。RPLA檢測,則取具96個V型底孔洞之微滴盤(microtiter plate),各孔洞,依序加入25 μ l稀釋液,不同稀釋倍數之測試樣品及已sensitized之四種Latex A, B, C, D, 以60 rpm振盪10分鐘後,在溫室下保溫靜置18-20小時。同時以腸毒素A, B, C, D四型,分別加入已sensitized之乳膠(latex)當positive control,另取未sensitized之乳膠25 μ l,加於僅含25 μ l稀釋液之孔洞中,做為negative control。

(四)黃色葡萄球菌total DNA的抽取

依Ausubel et al.⁽¹¹⁾及Neill et al.⁽¹²⁾所述方法修飾行之。其方法如前報⁽⁸⁾所述。

(五)聚合酶鏈反應

取0.6 ml微量離心管(eppendorf tube)分別加入10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTD各2 μ l, 10 $\times$ PCR緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 60 mM MgCl₂, 0.1% gelatin和1% Triton X-100) 10 μ l, 35 pmdes/ μ l的引子5 μ l, 目標菌DNA(約1000 ng), 2.5 unit的Taq DNA聚合酶,以蒸餾水使其終體積為100 μ l,最後在此溶液上滴入100 μ l的礦物油(mineral oil),加蓋後放入熱循環器(thermal cycler, Coy, Ann Arbor, Mich., USA)中,進行PCR反應。其條件如下:先升溫至94°C, 1.5分鐘,使DNA分成單股,再降溫進行黏合作用(annealing):對A1/A2引子降至67°C,維持2分鐘, B1/B2, C1/C2及D1/D2引子為63°C維持2分鐘, E1/E2引子為62°C維持2分鐘;接著進行延伸(extension),對A1/A2升溫至72°C維持2分鐘, B1/B2, C1/C2及D1/D2為2.5分鐘及E1/E2為3分鐘。如此擴增

Table 1. Oligonucleotide primers used for the detection of staphylococcal enterotoxin genes.

Primer	Enterotoxin	Base No.	Nucleotide sequence (Location, Direction)
A ₁	AEA	24	5'AAA GTG CCG ATC ATT TTA TGG CTA 3'(372-395, →)
A ₂	SEA	24	5'GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA 3' (588-565, ←)
B ₁	SEB	21	5'TCG CAT CAA ACT GAC AAA CGA 3'(312-332, →)
B ₂	SEB	24	5'CAC TTT TTC TTT GTC GTA AGA TAA 3' (719-696, ←)
C ₁	SEC ₁ ,SEC ₂ ,SEC ₃	24	5'AAC ATT AGT GAT AAA AAA CTG AAA 3' (154-177, →)
C ₂	SEC ₁ ,SEC ₂ ,SEC ₃	24	5'TTG TAA GTT CCC ATT ATC AAA GTG 3' (387-364, ←)
D ₁	SED	24	5,GCA GAT AAA AAT CCA ATA ATA GGA 3'(76-99, →)
D ₂	SED	24	5'ATC TAA AGA AAC TTC TTT TTG TAC 3'(408-385, ←)
E ₁	SEE	21	5'TTA CAA AGA ATT GCT TTA AGC 3'(43-63, →)
E ₂	SEE	18	5'TAA ACC AAA TTT TCC GTG 3'(498-481, ←)

目標DNA,共經過35個循環,即可進行PCR產物之膠體電泳分析。電泳分析係取10 μ l之PCR反應物,以1.8%高純度的洋菜膠進行電泳。PCR產物分子量判定,則依同時電泳的DNA marker,如Hae III-digested Φ X 174 DNA (Biolabs, Beverly, Mass., USA)比對而得。

(六)應用PCR方法檢測不同食品中腸毒素型金黃色葡萄球菌

稱取豬肉,雞肉,鴨肉,魚肉或香腸(購自台中第三市場)及某廠牌乳酪(cheese)各20克與160 ml 0.1%蛋白胨稀釋液,以打碎機(Waring blender)快速打碎45秒,吸取0.9 ml均質液至微量離心管,分別加入不同稀釋倍數腸毒素型金黃色葡萄球菌菌液0.1 ml,使每ml混合液中含目標菌數為10-100 CFU;再加入10.0 μ l 10% SDS,於室溫下作用20分鐘後,再加入100 μ l proteinase K (1 mg/ml), 65°C下維持30分鐘,1300xG離心10分鐘,並去除上清液後,加入200 μ l Lysostaphin緩衝液和10 μ l Lyso-staphin (終濃度10 units/ml)混合均勻,置於37°C

保持2小時;total DNA之製備及聚合酶鏈反應之條件則如前述。此外,市場購得之樣品亦先以BAM方法及RPLA法確定無金黃色葡萄球菌之污染及腸毒素的存在。各均質後之食品樣品並以plate count agar測定其所含菌數。牛乳樣品之處理則直接取0.9 ml的樣品,加入0.1 ml的菌液,以SDS及proteinase K處理,再依上述方法進行PCR檢測。

結果與討論

一、聚合酶鏈反應使用之引子(primers)

本研究室於前報^(8,9)中曾發現五組高特異性的PCR引子,分別編號為A1/A2, B1/B2, C1/C2, D1/D2及E1/E2,分別可用來偵測金黃色葡萄球菌之不同腸毒素基因,包括SEA, SEB, SEC, SED, SEE腸毒素。這些PCR引子之DNA序列如表一所示。經適當選擇PCR反應條件,而以腸毒素A, B, C, D,及E型金黃色葡萄球菌標準菌株的total

DNA為目標DNA,進行PCR反應,可分別獲得分子量大為210, 410, 234, 333及456 bp之產物^(8,9),這些產物的分子量與各毒素基因序列⁽¹³⁻²⁰⁾所推斷的各對引子間距離之DNA分子量大一致,各腸毒素型金黃色葡萄球菌彼此間並無干擾現象之發生。而且,非腸毒素型葡萄球菌及其他非葡萄球菌屬細菌;在上述之聚合酶鏈反應條件下,均無任何PCR產物產生^(8,9)。因此,本研究乃使用上述五組PCR引子,做為多種不同食品中此類病原菌之檢測,以瞭解這些PCR引子之應用性。

二、以PCR方法檢測牛乳,豬肉及香腸中腸毒素型金黃色葡萄球菌

金黃色葡萄球菌在自然界中分佈相當廣泛,在人類或動物的皮膚,口腔,鼻腔和傷口均可發現,常經由不衛生的操作習慣而污染食品,其中以肉類⁽²¹⁾及乳類為最常發生食物中毒的食品。本研究由超級市場購買牛乳樣品及香腸做為檢驗的樣品,首先以傳統檢驗法,如BAM方法⁽¹⁰⁾,確定上述食品並無金黃色葡萄球菌腸毒素的污染後;取一定量的樣品與0.1%蛋白胨稀釋液經絞碎機均質化後,加入新鮮培養並稀釋成不同濃度的各腸毒素型金黃色葡萄球菌液,依材料與方法所述,進行DNA抽取及PCR檢測,結果如圖一~三所示,顯示出經人為污染之金黃色葡萄球菌的牛乳,豬肉及香腸樣品,在菌數低達每克食品含10-100 CFU下,仍能以本研究所建立的PCR方法偵測出來。

三、其他肉類食品中腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測

由於欲瞭解前述PCR方法,可否應用於其它肉類食品,包括家禽類的雞,鴨及魚類食品中,腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測,本研究亦由傳統市場購買新鮮之上述食品,依前項所述豬肉及香腸中金黃色葡萄球菌之檢測方式,探討本報告所述PCR方法之實用性,其結果如表二所示。由表二中之BAM方法可見上述食品皆不含自然污染之腸毒素型金黃色葡萄球菌,而食品中只要每克食品含10-100 CFU菌數之目標菌,即可以本報告所述方法檢測其存在。此外,於表二中,吾人亦可見於本研究所述之實驗條件下,不同肉類本身所含之DNA,對於本研究所之PCR方法並未干擾檢測結果。

四、乳酪中腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測

由於Wernars等人⁽²³⁾發現他們所用的PCR引子在檢測 *Listeria monocytogenes* 時,隨著供測試

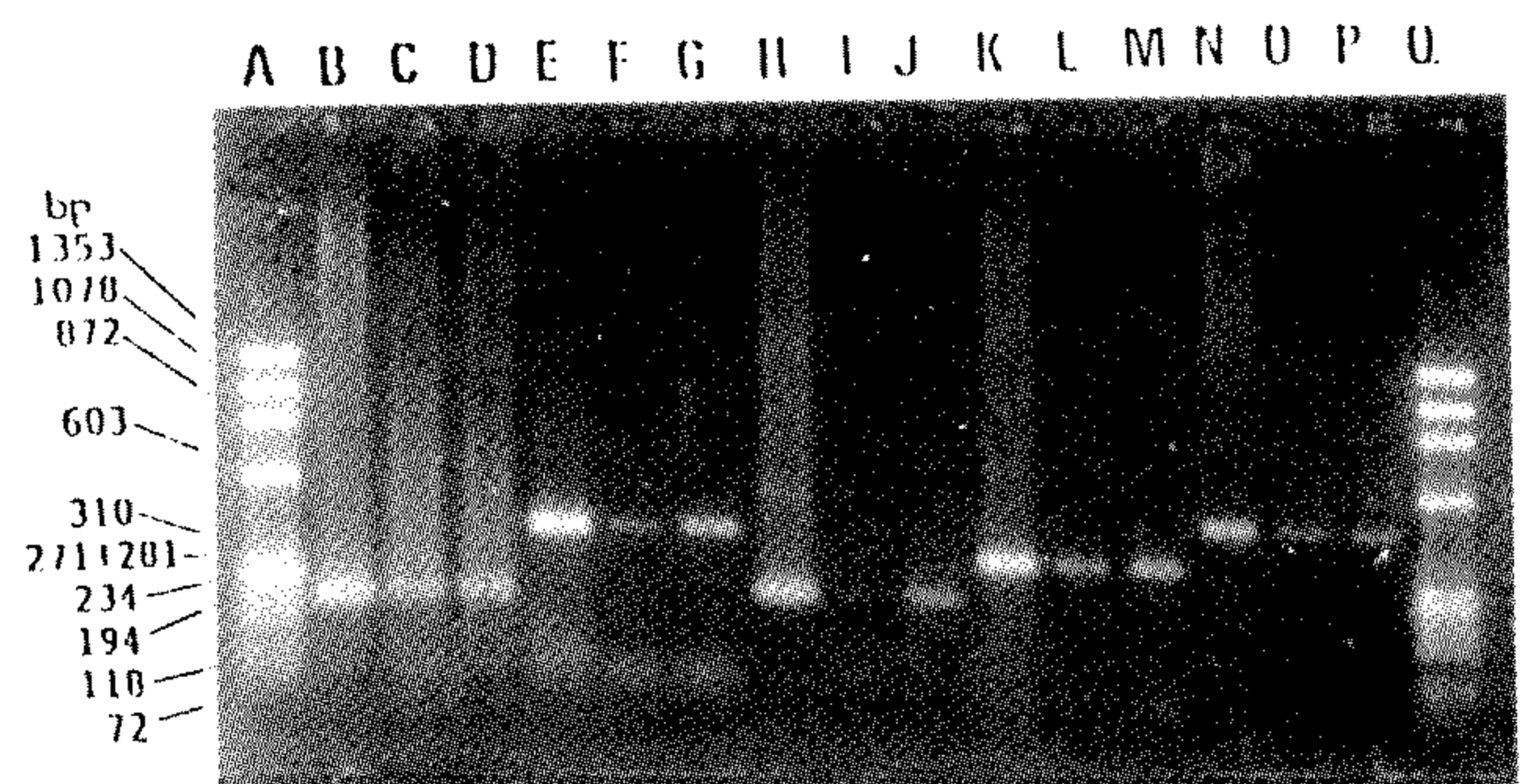


Figure 1. PCR detection of enterotoxigenic *S. aureus* in enterotoxigenic *S. aureus* inoculated fresh milk. Conditions for PCR reaction with primer pairs A₁/A₂, B₁/B₂, C₁/C₂, D₁/D₂ and E₁/E₂ were described in Materials and Methods. Ten microliters of the PCR reaction mixtures were subjected to 1.8% agarose gel electrophoresis and visualized with U. V. (302nm) transilluminator. Lane A, Q: Hae III digested Φ X 174 (RF) DNA, serving as marker DNA. PCR was performed with DNA isolated from fresh milk samples inoculated with 10-100, 100-1000 and 1000-10000 CFU of *S. aureus* per gram of sample. Lanes C and D. Lanes F and G, Lanes I and J, Lanes L and M and Lanes O and P, represent PCR products from fresh milk samples inoculated with *S. aureus* type A (ATCC 13565), B (ATCC 14458), C (ATCC 19059), D (ATCC 23235), and E (ATCC 27664) strains, respectively. Lanes B, E, H, K and N were positive controls with 1000 ng DNA from *S. aureus* type A (ATCC 13565), B (ATCC 14458), C (ATCC 19059), D (ATCC 23235), and E (ATCC 27664) strains, respectively.

軟質乾酪(soft cheese)樣品品牌的不同而有不同的敏感性,某些品牌的乾酪,其目標菌之污染濃度需為 10^3 cells/0.5 g食品,始可以觀察出PCR產物,但有些品牌的乾酪,其目標菌菌數達 10^8 cells/0.5 g食品,還仍然沒有足夠的PCR產物可供觀察。因此,本研究亦探討本文所述PCR方法,對乳酪中腸毒素型金黃色葡萄球菌之檢測的可行性;結果如圖四所示,在本研究所使用之DNA抽取及PCR條件下,每克乳酪只要含有10-100 CFU目標菌,即可清楚的以PCR方法檢測出來。由於Wernars等人⁽²³⁾之PCR檢測目標菌為 *Listeria monocytogenes*,而本研究使用之目標菌為金黃色葡萄球菌,且本研究使用

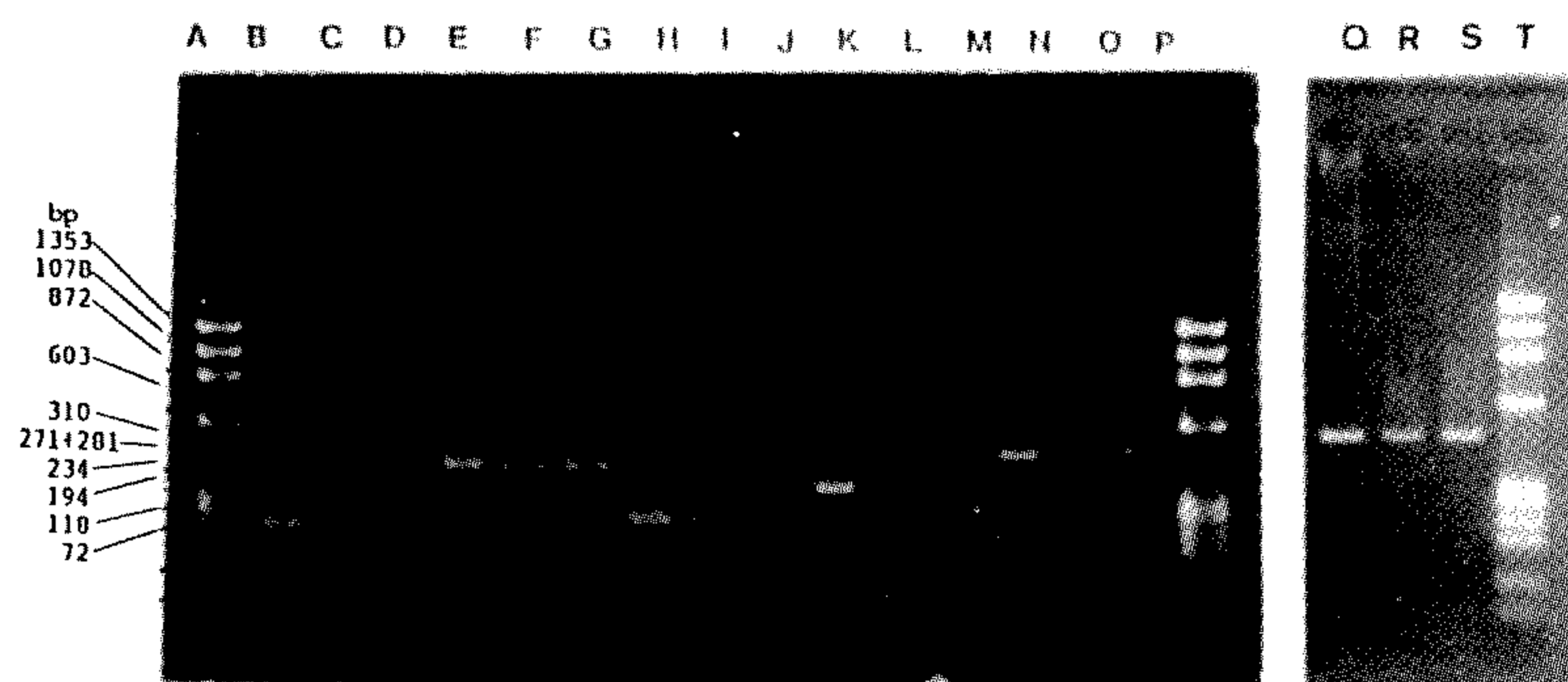


Figure 2. PCR detection of enterotoxigenic *S. aureus* in enterotoxigenic *S. aureus* inoculated pork samples. Conditions for PCR reaction with primer pairs A₁/A₂, B₁/B₂, C₁/C₂, D₁/D₂, and E₁/E₂ were as described in Materials and Methods and in Figure 1. except that the sample used was pork. Lanes Q, R, S, T are repeated data for lanes M, N, O, and P.

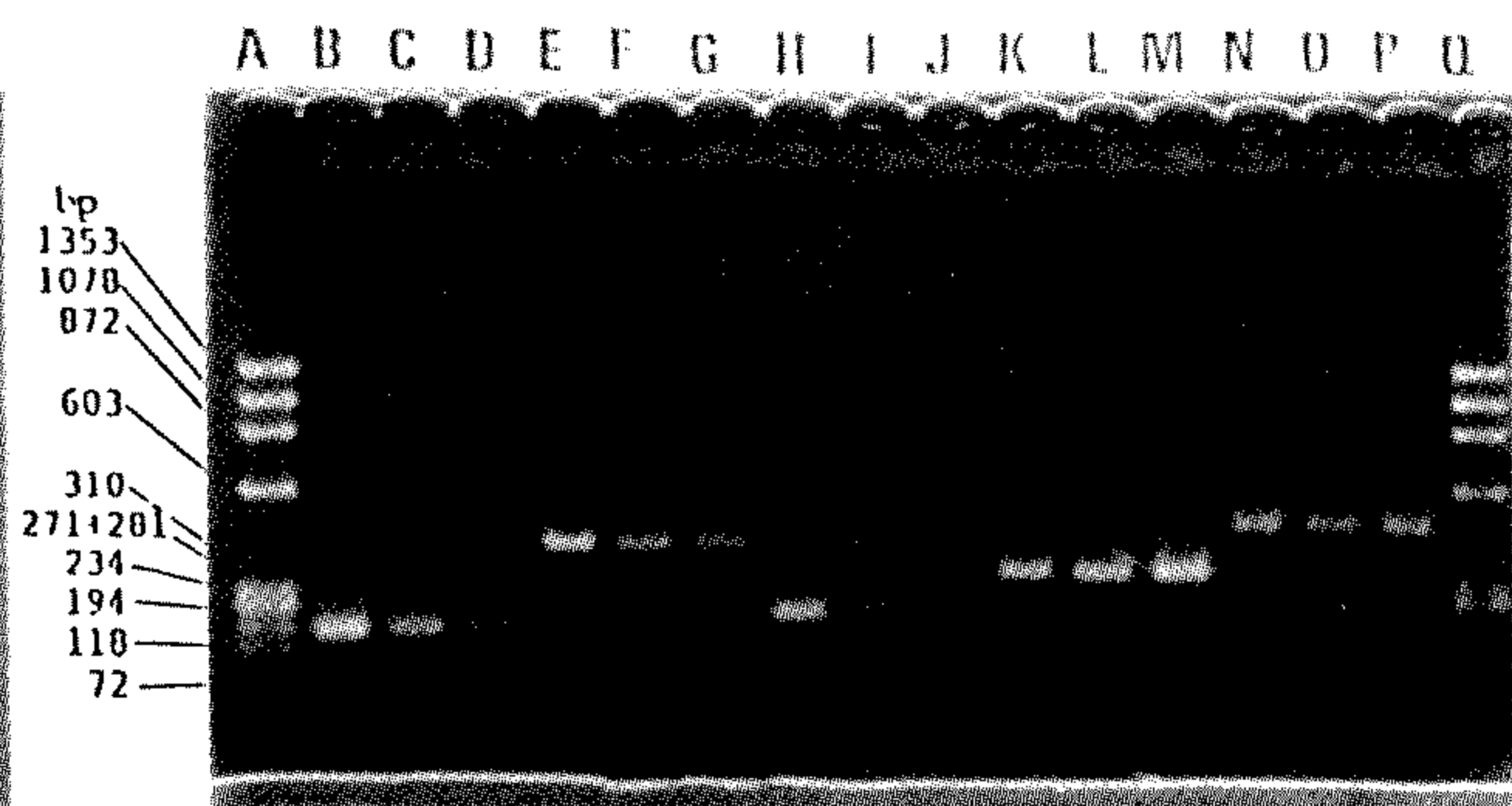


Figure 3. PCR detection of enterotoxigenic *S. aureus* in enterotoxigenic *S. aureus* inoculated sausage samples. Conditions for PCR reaction with primer pairs A₁/A₂, B₁/B₂, C₁/C₂, D₁/D₂, and E₁/E₂ were as described in Materials and Methods and in Figure 2. except that the sample used was sausage.

Table 2. Detection of *Staphylococcus aureus* in *S. aureus* spiked and non-spiked chicken, duck and fish with BAM^a method and PCR primers^b specific for genes of enterotoxins.

Sample	No. of <i>S. aureus</i> inoculated ^c	SEA		SEB		SEC		SED		SEE	
		BAM	PCR	BAM	PCR	BAM	PCR	BAM	PCR	BAM	PCR
Chicken	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁰	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
	10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Duck	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁰	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
	10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fish	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10 ⁰	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
	10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Experimental conditions were described in Materials and Methods. The enterotoxigenic *S. aureus* strains inoculated were ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19059 (SEC), ATCC 23235 (SED) and ATCC 27664 (SEE), respectively.

^a BAM: Bacteriological Analytical Manual.
^b The PCR primers used for SEA, SEB, SEC, SD and SEE *S. aureus* detection were Ap, Bp, Cp, and Ep, respectively. Ap: primers A₁, A₂; Bp: primers B₁, B₂; Cp: primers C₁, C₂; Dp: D₁, D₂; Ep: E₁, E₂.
^c Number of *S. aureus* inoculated per gram of food. 10⁰, 10¹, and 10² mean < 10, <100, and < 1000 CFU per gram of food.



Figure 4. PCR detection of enterotoxigenic *S. aureus* in enterotoxigenic *S. aureus* inoculated sausage samples. Conditions for PCR reaction with primer pairs A₁/A₂, B₁/B₂, C₁/C₂, D₁/D₂, and E₁/E₂ were as described in Materials and Methods and in Figure 2. except that the sample used was cheese.

之DNA抽取方法與其不同。因此，這些差異，或許影響了以PCR方法檢測乳酪中目標菌之不同靈敏度(sensitivity)。

最近，有關食品中成分，抑制PCR反應因子之研究，已見諸文獻報告⁽²⁴⁾；本研究所用的方法，主要在DNA抽取方法上與Wernars等人⁽²³⁾所用方法不同，本研究所使用之方法，雖稍嫌繁複，但可能有效去除食品樣品中，抑制PCR反應的因子，可提供PCR檢測之高靈敏度，以供檢驗單位參考之用。

此外；由於本研究使用之食品，除牛乳外，皆含高量之雜菌，例如：每克豬肉之生菌數為 3.3×10^5 CFU，而每克香腸所含之生菌數為 2.07×10^4 CFU，而未接種腸毒素型金黃色葡萄球菌的這些食品，在本研究所使用之PCR條件下，並不產生對應之PCR產物，而BAM方法亦無法檢測出這些雜菌中含有腸毒素型金黃色葡萄球菌，因此，這些食品之組成分以及所含之污染菌，並不干擾PCR之檢測結果。

以PCR的方法來檢測食品中微生物亦可能導致死菌與活菌之無法區分，例如：低溫殺菌食品(pasteurized food)，已經熱處理，其病原菌大部分均已死滅，死菌中之DNA，如果引子黏接及擴增用的DNA區域仍屬完整，則PCR反應的結果仍為正反應。

為瞭解以PCR方法，分辨死菌及活菌的可行性；Lampel等人⁽²⁵⁾，曾建議將檢驗樣品作一短時間適當增值後，再經系列稀釋，抽取DNA，檢測其PCR產物，由於死菌無法增殖，其菌數將被稀釋至PCR無法檢測出，而得以與活菌區別之；本研究曾發現，PCR使用之循環數與目標菌之檢測靈敏度，

有密切的關係，以B型腸毒素型金黃色葡萄球菌之PCR檢測為例，當PCR循環數為35時，10 CFU以下個菌數的DNA可檢測出；然而當PCR循環數為25時，可見到PCR產物之檢測所需菌數，則為1000~10000 CFU；因此，檢測靈敏度的不同，配合Lampel等人⁽²⁵⁾的理論，將可使我們區別腸毒素型金黃色葡萄球菌之死菌及活菌。總而言之，本報告所述之PCR方法，由於可以偵測到腸毒素基因，加上高度的特異性，靈敏度及方法快速，故可做為食品樣品中毒事件前的預防工作或中毒事件後的確認試驗，以輔助金黃色葡萄球菌腸毒素本身的檢驗工作。事前的篩選工作，可儘早發現腸毒素基因的存在，顯示該食品如果儲存不當即有造成食物中毒的潛在危機，達到預防效果。而如前所述，由於血清學之免疫方法均針對菌體的毒素本身做為檢測依據，易因抗體的特異性，毒素產量不足檢測所需，抑或食品成分的干擾而造成檢測誤差，此時可以PCR方法做為檢測結果的確認之用。

誌 謝

本報告承行政院衛生署支持(計劃編號：DOH-82-TD 035及DOH 81-085)，得以完成，特此誌謝。

參考文獻

1. 衛生署. 1991. 民國79年食品中毒發生狀況. 行政院衛生署印行. 台北. 台灣.
2. Genigeorgis, C. A. 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* 9 : 327-360.
3. 行政院衛生署. 1986. 食品衛生檢驗手冊. pp. 59-72. 行政院衛生署印行.
4. Park, C. E., Akhtar, M. and Rayman, M. K. 1992. Nonspecific reaction of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2509-2512.
5. Jorge, V., Esperanza, G. L., Segundoi, P., Joaquin, G., Ordan, J. A. and Santiago, V. 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1323-1326.
6. Wilson, I. G., James, C. E. and Rthur, G. A.

1991. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1793-1798.
7. Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R. and Rozee, K. R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29 : 426-430.
8. Tsen, H. Y. and Chen, T. R. 1992. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 685-690.
9. 曾浩洋, 陳桐榮, 虞積凱. 1994. 以聚合酶鏈反應檢測具B, C型腸毒素基因之金黃色葡萄球菌. 中國農業化學會誌. 32 : 322-331.
10. FDA. 1984. Bacteriological analytical manual. 6th ed. Food and Drug Administration. Washington, D.C. USA.
11. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. M., Smith, J. A. and Struhl, K. 1987. Current protocols in molecular biology. Wiley. New York, USA.
12. Neill, R. J., Fanning, G. R., Delanhoz, F., Wolff, R. and Gemski, P. 1990. Oligonucleotide probes for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* strains containing genes for enterotoxins A, B and C and toxic shock syndrome toxin 1, J. Clin. Microbiol. 28 : 1514-1518.
13. Jones, C. L. and Khan, S. A. 1986. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 166 : 29-33.
14. Hovde, C. J., Hackett, S. P. and Bohach, G. A. 1990. Nucleotide sequence of the all staphylococcal enterotoxin C genes: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. Mol. Gen. Genet. 220 : 329-333.
15. Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. 1987. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and the relatedness to other pyrogenic toxins. Mol. Gen. Genet. 209 : 15-20.
16. Bayles, K. W. and Iandole, J. J. 1989. Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J. Bacteriol. 171 : 4799-4806.
17. Betley, M. and Mekalanos, J. J., 1988. Nucleotide sequence of type A staphylococcal enterotoxin gene. J. Bacteriol. 170 : 34-41.
18. Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. 1989. Conservation of the biologically active portions of staphylococcal enterotoxin C1 and C2. Infect. Immun. 57 : 2249-2252.
19. 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 : 2954-2960.
20. Couch, J. L., Soltis, M. T. and Betley, M. J. 1989. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. J. Bacteriol. 171 : 4507-4510.
21. O'Meara, G. M. and Munro, P. A., 1984. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. Meat Sci. 11 : 227-238.
22. Bryan, F. L. 1983. Epidemiology of milk-borne disease. J. Food Prot. 46 : 637-649.
23. Wernars, K., Heuvelman, C. J., Chakraborty, T. and Notermans, S. H. W. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J. Appl. Bacteriol. 10 : 121-126.
24. Rossen, L., Norkov, P., Homstrom K. and Rasmussen, O. F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int. J. Food Microbiol. 17 : 337-345.
25. Lampel, K. A., Jagow, J. A., Trucksess, M. and Hill, W. E. 1990. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1536-1540.

Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Specific Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Various Food Samples

HAU-YANG TSEN, *TONG-RONG CHEN AND GEE-KAITE YU

Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

**Department of Food Technology, National Chia-Yi Institute of Agriculture, Chia-Yi, Taiwan, ROC.*

ABSTRACT

In this study, PCR primers specific for *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes were used for the detection of enterotoxigenic *S. aureus* in foods. Neither the naturally occurring microflora in the food samples nor the food components would interfere with the detection. Study on the detection sensitivity showed that when PCR cycles were 35, DNA from < 10 CFU per ml of target bacterium in culture broth or < 100 CFU per gram of food sample could be detected.

However, when the PCR cycles were reduced to 25, the cell numbers required for positive reaction were > 1000 CFU per ml of culture broth. Therefore, a short enrichment of target cells followed by suitable dilution and PCR using a suitable number of cycles could detect viable bacteria. Non-viable cells which could not grow would be diluted out and not be detected by PCR.

Key Words : Polymerase chain reaction, Enterotoxins, *S. aureus*.