

食品微生物之檢驗方法－金黃色葡萄球菌之檢驗

修正草案總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品微生物之檢驗方法－金黃色葡萄球菌之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、增列第一部第二節檢驗方法之說明。
- 二、第一部器具及材料增列生物安全操作櫃、濾紙及褐色試藥瓶，另修正無菌濾膜。
- 三、第一部試藥增列部分化學試藥及微生物級試藥。
- 四、「胰化酪蛋白大豆培養基」增列斜面培養基配製方法。
- 五、2.4.3.節及 2.4.4.5.節之「BHI 培養液」修正為「BHI 增菌液」。
- 六、增列第二部：金黃色葡萄球菌之 real-time PCR 檢測。
- 七、增列參考文獻及檢驗流程圖。

食品微生物之檢驗方法—金黃色葡萄球菌之檢驗

修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<u>第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗</u> 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：<u>檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養之方法。</u> 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： <u>2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</u> 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. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)。</u> 2.2.13. 加熱器。 2.2.14. 吸管輔助器(Pipette aid)或<u>微量分注器。</u> 2.2.15. 微量吸管尖(Tip)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.16. 吸管(Pipette)：已滅菌，1 mL	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 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. 乾熱滅菌器。 2.2.2. 高壓滅菌釜。 2.2.3. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。 2.2.6. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。 2.2.7. 天平：可稱量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g，靈敏度為 5 mg。 2.2.8. 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2.10. 離心機：轉速可達 3000 rpm 以上。 2.2.11. pH 測定儀。 2.2.12. 加熱器。 2.2.13. 吸管輔助器(Pipette aid)。 2.2.14. 微量吸管(Micropipette)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.15. 吸管(Pipette)：已滅菌，1 mL	一、增列第一部第二節檢驗方法之說明。 二、第一部器具及材料增列生物安全操作櫃、濾紙及褐色試藥瓶，另修正無菌濾膜。 三、第一部試藥增列部分化學試藥及微生物級試藥。 四、「胰化酪蛋白大豆培養基」增列斜面培養基配製方法。 五、2.4.3. 節及 2.4.4.5. 節之「BHI 培養液」修正為「BHI 增菌液」。 六、增列第二部：金黃色葡萄球菌之 real-time PCR 檢測。 七、增列參考文獻及檢驗流程圖。 八、增修訂部分文字。

吸管應有 0.01 mL 之<u>刻度</u>；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 之<u>刻度</u>。 2.2.17. 培養皿：已滅菌，內徑約 9 <u>cm</u>，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 × 100 mm，13 × 100 mm 試管或其他適用者。 2.2.20. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 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，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。 2.2.25. 曲<u>玻棒</u>：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。 2.2.26. <u>濾紙及褐色試藥瓶</u>。 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(<u>dextrose</u>)、甘露糖醇(mannitol)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、液態石蠟油或礦物油、<u>甘氨酸(glycine)</u>、氯化鋰($\text{LiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、<u>酚紅(phenol red)</u>、<u>去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)</u>、<u>氯化鈣(CaCl_2, anhydrous)</u>、<u>甲苯胺藍 O (toluidine blue O)</u>、<u>三甲醇胺基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]</u>及乙醇等均採用化學試藥級。蛋白胨(<u>peptone</u>)、溶菌素(lysostaphin)、<u>胰化蛋白胨(tryptone)</u>、牛肉抽出物(beef	吸管應有 0.01 mL 之<u>刻度</u>、5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。 2.2.16. 吸管尖(Tip)：可滅菌。10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.17. 培養皿：已滅菌，內徑約 <u>90 mm</u>，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 × 100 mm，13 × 100 mm 試管或其他適用者。 2.2.20. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性醋酸纖維濾膜。 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，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、<u>壓舌板</u>及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。 2.2.25. <u>塗抹曲棒</u>：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。 2.2.26. 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、甘露糖醇(mannitol)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、液態石蠟油或礦物油及乙醇等均採用化學試藥級。蛋白胨、溶菌素(lysostaphin)、及凝固酶血漿(兔來源，經 EDTA 處理)採用微生物級。	
--	--	--

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)^(註)	2.2.27. 試劑 2.2.27.1. 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。 2.2.27.2. 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 0.22 μm 孔徑濾膜過濾，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。 2.2.27.3. 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。 2.2.27.4. 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。 2.2.27.5. 液態石蠟油或礦物油：取液態石蠟油或礦物油 20~50 mL，裝入附蓋容器中約 1/2 滿，以 121℃滅菌 30 分鐘。 2.2.27.6. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註)	
--	---	--

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°C 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 1N 氫氧化鈉溶液調 pH 值為 7.2，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C 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	2.2.27.6.1. 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。 2.2.27.6.2. 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，以此洗液併入，使溶液達 300 mL。 2.2.27.6.3. 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；自行配製者，應檢查其染色效果。 2.2.28. 稀釋液 2.2.28.1. 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°C 滅菌 15 分鐘。 2.2.28.2. 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 1N 氫氧化鈉溶液調 pH 值為 7.2，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C 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。 2.2.28.3. 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。 2.2.28.4. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)：取蛋白胨 10 g，氯化	
---	--	--

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℃ 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 ₂ O)	5 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	950 mL

加熱溶解後以 121℃ 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℃ 時加入 EYT，基礎培養基：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℃，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

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℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。

2.2.29. 培養基

2.2.29.1. 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 ₂ O)	5 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	950 mL

加熱溶解後以 121℃ 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℃ 時加入 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℃，使用期限以不超過 5 天為宜。

2.2.29.2. 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(Na_2HPO_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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone)	15 g
植物蛋白胰 (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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。冷卻至 50°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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 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)

胰化酪蛋白胰(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°C 滅菌 10 分鐘後立即冷卻，最終 pH 值為 7.4 ± 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(CaCl_2 , anhydrous)	1.1 mg
氯化鈉	10 g

氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。

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

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

加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 ，分裝於試管者作成斜面培養基。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	1 g
酚紅(phenol red)	0.018 g
氯化鈉(NaCl)	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°C 滅菌 10 分鐘後立即冷卻，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。

2.2.29.5. 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(CaCl_2 , anhydrous)	1.1 mg
氯化鈉(NaCl)	10 g

甲苯胺藍 O (toluidine blue O)	0.083 g	甲苯胺藍 O (toluidine blue O)	0.083 g
三 甲 醇 胺 基 甲 烷 [tris(hydroxymethyl)amino methane]	6.1 g	三 甲 醇 胺 基 甲 烷 [tris(hydroxymethyl)amino methane]	6.1 g
洋菜(agar)	10 g	洋菜(agar)	10 g
蒸餾水	1000 mL	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	胰化酪蛋白胨 (trypticase peptone)	17 g
植物蛋白胨 (phytone peptone)	3 g	植物蛋白胨 (phytone peptone)	3 g
氯化鈉	100 g	氯化鈉(NaCl)	100 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.5 g	磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖(dextrose)	2.5 g	葡萄糖(dextrose)	2.5 g
丙酮酸鈉(sodium pyruvate)	10 g	丙酮酸鈉(sodium pyruvate)	10 g
蒸餾水	1000mL	蒸餾水	1000mL

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。置於 4±1℃貯存，時間以不超過 1 個月為宜。

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。

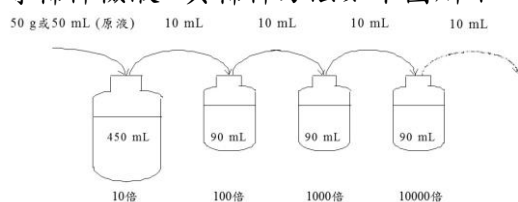
2.3.3. 液態檢體：可用振搖方式，使充分均勻混合，取檢體 50 mL，即為原液，以下步驟同 2.3.1 節之操作。

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 2.3.1₂ 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 2.3.1₂ 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，添加蛋白胨緩衝液 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. 除肉製品使用蛋白胨稀釋液外，其他檢體通常以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液。

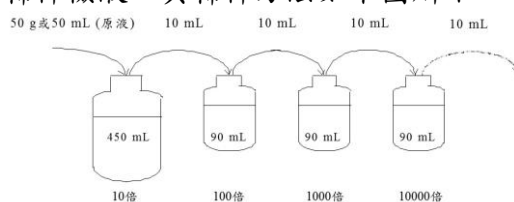
2. 檢體總量不足 50 g (mL) 時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成 10 倍稀釋檢液。

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。

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 2.3.1₂ 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 2.3.1₂ 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，添加蛋白胨緩衝液 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震盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，其溶出液供作檢液。

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。

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℃ 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^(註)，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℃ 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	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℃ 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^(註)，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℃ 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℃ 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℃ 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<u>後水洗，水洗時間應不超過 5 秒鐘</u>。 (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<u>以水洗，此步驟需時甚短，僅數秒即可</u>，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) <u>自然風乾</u>。 (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<u>以 BHI 增菌液 0.2~0.3 mL 中</u>，於 35℃	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℃ 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℃ 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)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<u>，水洗</u>。 (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<u>僅約 30 秒</u>，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。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 培養液 0.25 mL 中，於 35	
---	--	--

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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，接種於酚紅甘露糖醇培養液中，再徐徐

°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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，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 斜面培養基上鈎菌，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. 節之 BHI 增菌液置於沸水中加熱 15 分鐘後，冷卻。吸取培養液約 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。 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	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. 節之 BHI 培養液置於沸水中加熱 15 分鐘後，冷卻。吸取培養液約 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。 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。
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。

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)。

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

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。
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。

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)。

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. <u>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。</u> <u>第二部：金黃色葡萄球菌之 real-time PCR 檢測</u> <u>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。</u> <u>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。</u> <u>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。</u> <u>2.2. 裝置^(註 1)</u> <u>2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。</u> <u>2.2.2. 高壓滅菌釜。</u> <u>2.2.3. 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II) (含)以上者。</u> <u>2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。</u> <u>2.2.5. 微量冷凍離心機 (Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4℃ 溫控功能。</u> <u>2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。</u> <u>2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。</u> <u>2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20</u>	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. <u>可參考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，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。</u>	
--	--	--

℃)功能。 <u>2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</u> <u>2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。</u> <u>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。</u> <u>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。</u> <u>2.3. 試藥</u> <u>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。</u> <u>2.3.2. Real-time PCR 用^(註 2)</u> <u>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</u> <u>2.3.2.1.1. 金黃色葡萄球菌菌種鑑別基因(標的基因：nuc)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-AAATTACATAAAGAACCTGCGACA-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-GAATGTCATTGGTTGACCTTTGTA-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-AATTTAACCGTATCACCA TCAATCGCTTT-(BHQ1)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 64 bp</u> <u>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)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-TTTGGAACGGTTAAAACGAATAAG-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGC TTGA-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-CTGTTTCAGGAGTTGGATC-(MGB)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 80 bp</u> <u>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)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-AGGTGACTGCTCAAGAATTAGATTACC-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-AAGGCGAGTTGTTAAATTCATA</u>		
---	--	--

<u>GAGTT-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-AACTCGTCACTATTTGG</u> <u>TG-(MGB)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 84 bp</u> <u>2.3.2.1.4. 金黃色葡萄球菌 C 型腸毒</u> <u>素鑑別基因(標的基因：entC)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-GGCGATAAGTTTGACCAATCTA</u> <u>AATAT-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-AAGGTGGACTTCTATCTTCACA</u> <u>CTTTT-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-TGTACAACGACAATAAA</u> <u>-(MGB)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 90 bp</u> <u>2.3.2.1.5. 金黃色葡萄球菌 D 型腸毒</u> <u>素鑑別基因(標的基因：entD)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-CACAAGCAAGGCGCTATTTG-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-TCGGGAAAATCACCCCTTAACA-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-ATACAGCGCGGAAA-(M</u> <u>GB)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 151 bp</u> <u>2.3.2.1.6. 金黃色葡萄球菌 E 型腸毒</u> <u>素鑑別基因(標的基因：entE)</u> <u>引子 F：</u> <u>5'-CTTTGGCGGTAAGGTGCAA-3'</u> <u>引子 R：</u> <u>5'-ACCGTGGACCCTTCAGAAGA-3'</u> <u>探針 P：</u> <u>5'-(FAM)-AGGCTTGATTGTGTTTC</u> <u>A-(MGB)-3'</u> <u>PCR 增幅產物大小 60 bp</u> <u>註 2：合成之引子及探針，拆封後，</u> <u>以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分</u> <u>裝後置於-20℃貯存備用，另探針需避</u> <u>光保存，探針 5'端採用</u> <u>6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'</u> <u>端採用 Tetramethylrhodamine</u> <u>(TAMRA) 或 Minor Groove Binder</u> <u>(MGB)標記。</u> <u>2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter</u>		
---	--	--

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^(註 3)

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

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。

2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μ L。

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

<u>5 μM 引子 F</u>	<u>2.0 μL</u>
<u>5 μM 引子 R</u>	<u>2.0 μL</u>
<u>5 μM 探針</u>	<u>1.5 μL</u>
<u>TaqMan® Fast Reagents Starter Kit</u>	<u>12.5 μL</u>
<u>檢體 DNA 溶液</u>	<u>5.0 μL</u>
<u>無菌去離子水</u>	<u>2.0 μL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 μL</u>

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 $15000 \times g$ 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 $15000 \times g$ 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 $15000 \times g$ 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 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 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 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	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
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 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 <i>Staphylococcus aureus</i> 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.		
---	--	--

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1 mm 以上	原色	+

「+」表示 90%以上為正反應。

附表：最確數表

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 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

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 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	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

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

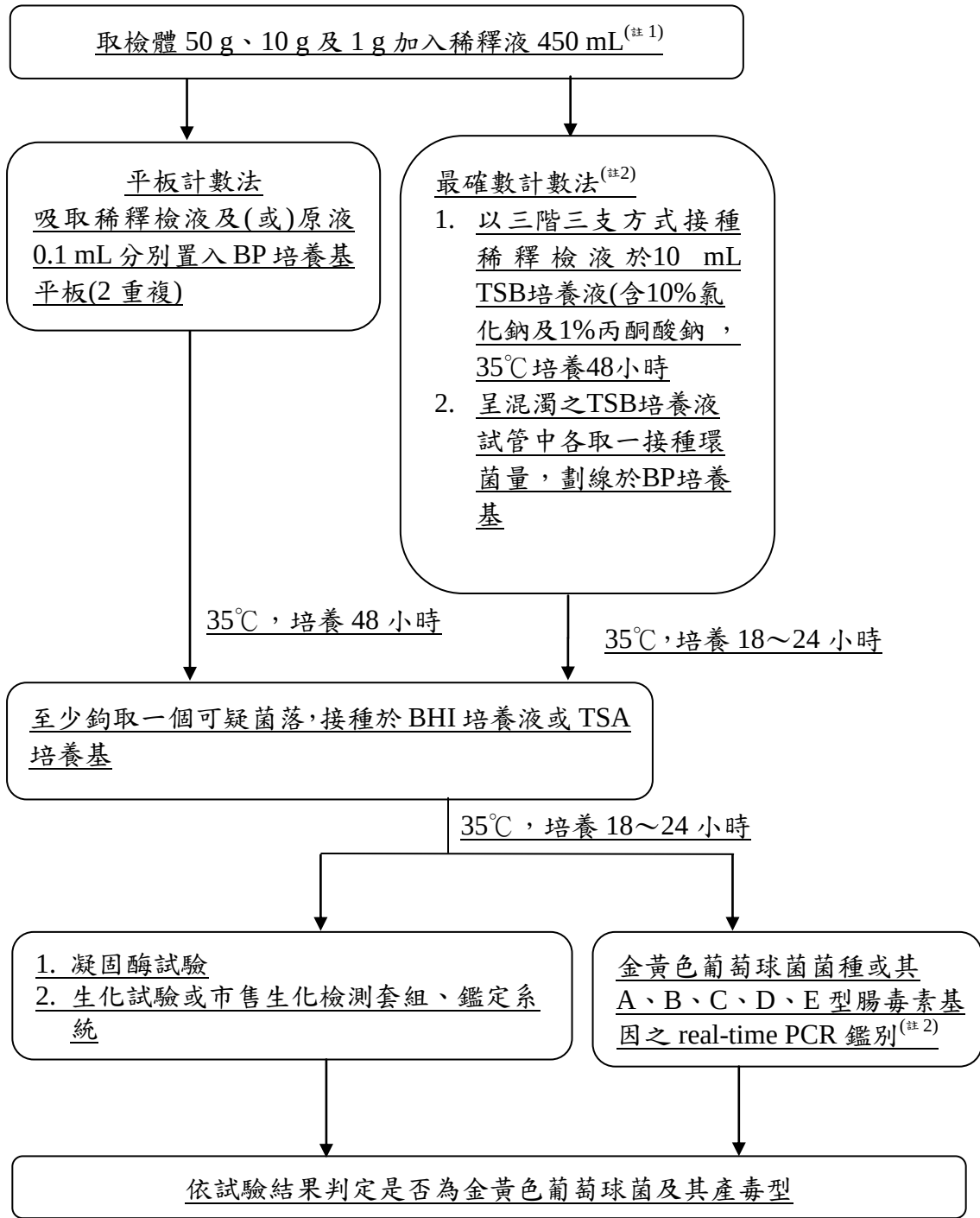
(2) 當接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，推算出

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

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

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

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。