

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*

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  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  及 1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.15. 吸管 (Pipette)：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度、5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
    - 2.2.16. 吸管尖 (Tip)：可滅菌。10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  及 1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.17. 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。
    - 2.2.18. 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，鉑銱或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.24. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.25. 塗抹曲棒：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。

#### 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  $\mu\text{m}$  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。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。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°C 滅菌 30 分鐘。

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

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。

## 2.2.29. 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 <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，以體積 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。

### 2.2.29.2. 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 (NaCl)                                | 5 g     |
| 磷酸氫二鈉 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 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)

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| 胰化酪蛋白朊 (trypticase peptone) | 15 g    |
| 植物蛋白朊 (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)

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| 胰化酪蛋白朊 (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 <sub>2</sub> , anhydrous)        | 1.1 mg  |
| 氯化鈉 (NaCl)                                 | 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。

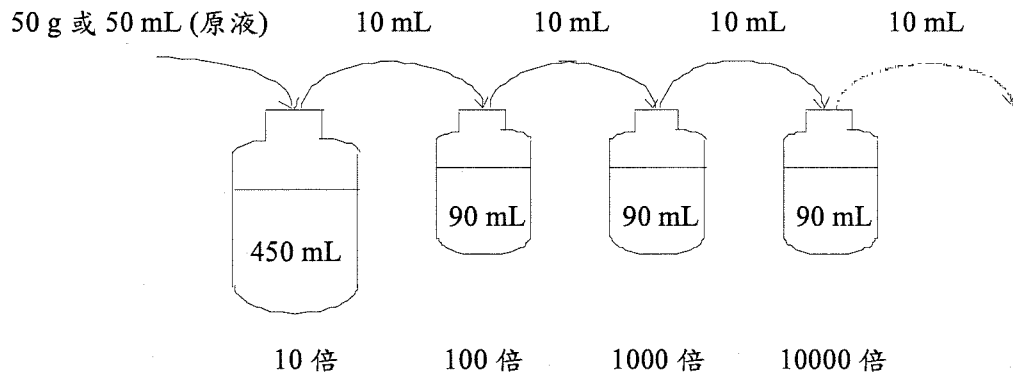
#### 2.2.29.6. 胰化酪蛋白大豆培養液 (含 10% 氯化鈉及 1% 丙酮酸鈉) (Trypticase soy broth (TSB) with 10% NaCl and 1% sodium pyruvate)

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| 胰化酪蛋白朊 (trypticase peptone) | 17 g    |
| 植物蛋白朊 (phytone peptone)     | 3 g     |
| 氯化鈉 (NaCl)                  | 100 g   |
| 磷酸氫二鉀 ( $K_2HPO_4$ )        | 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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為  $7.3 \pm 0.2$ 。

### 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°C，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°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°C 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) 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，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。金黃色葡萄球菌為革蘭氏陽性，菌體呈單一或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°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°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。

2.4.4.5. 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°C 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 1 mm 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

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

(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

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

## 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°C 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. 可參考使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。