

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

「食品微生物之檢驗方法－金黃色葡萄球菌之檢驗」自九十八年六月六日公告訂定，經歷二次修正，最近一次修正於一百零四年十月十三日。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」，本次參考國際方法Bacteriological Analytical Manual (BAM)修正培養溫度為36°C，並增列巴德派克培養基上生長非典型菌落之形態，另直接平板法進行菌數計算，為修整數據之有效位數至兩位，將第三位數字四捨六入，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、「第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗」主要依現有檢驗方法格式修正，其中「鑑別試驗」修正培養溫度為36°C，並增列「分離培養」中巴德派克培養基上生長非典型菌落之形態及「塗抹物(Swab)檢體之增菌培養」，另修正「計數」中「直接平板法菌數之計算」數據之有效位數至兩位，將第三位數字由四捨五入修正為四捨六入。
- 二、「第二部：金黃色葡萄球菌之 real-time PCR 檢測」係因即時聚合酶鏈反應器「Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System」已停產，故修正為「Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System」，其餘依現有檢驗方法格式修正。
- 三、修正「參考文獻」及「檢驗流程圖」。
- 四、修正部分文字。

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
<p style="text-align: center;">第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗</p> <p>1. 適用範圍：本方法適用於食品中金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 及其腸毒素 (enterotoxins) 之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養並以平板計數，或以三階三支培養並以最確數 (most probable number, MPN) 計數之方法。</p> <p>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。</p> <p><u>2.2. 裝置</u></p> <p>2.2.1. 生物安全操作櫃：第二等級 (class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2. 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在$170 \pm 10^{\circ}\text{C}$者。</p> <p>2.2.3. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。</p> <p>2.2.4. 冰箱：能維持$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$者。</p> <p>2.2.5. 培養箱：能維持內部溫度溫差在$\pm 1^{\circ}\text{C}$以內者。</p> <p>2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差在$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$以內者。</p> <p>2.2.7. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。</p> <p>2.2.8. 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g者，靈敏度為1 mg。</p> <p>2.2.9. 顯微鏡：能放大至1000倍以上者。</p> <p>2.2.10. 旋渦混合器。</p> <p>2.2.11. 離心機：可達$900 \times \text{g}$以上者。</p> <p>2.2.12. 酸鹼度測定儀。</p> <p>2.2.13. 電磁加熱攪拌器。</p> <p>2.2.14. 紅外線接種環滅菌器。</p> <p>2.2.15. 玻片加熱器。</p> <p>2.3. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鈉</p>	<p style="text-align: center;">第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗</p> <p>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。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經稀釋後，以選擇性培養基培養之方法。</p> <p>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。</p> <p><u>2.2. 器具及材料</u></p> <p>2.2.1. 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級 (class II)(含)以上者。</p> <p>2.2.2. 乾熱滅菌器。</p> <p>2.2.3. 高壓滅菌釜。</p> <p>2.2.4. 冰箱：能維持$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.6. 水浴：能維持水溫溫差在$\pm 0.2^{\circ}\text{C}$以內者。</p> <p>2.2.7. 攪拌均質器 (Blender) 或鐵胃 (Stomacher)：適用於無菌操作者。</p> <p>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。</p> <p>2.2.9. 顯微鏡：能放大至1000倍以上之一般光學顯微鏡。</p> <p>2.2.10. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。</p> <p>2.2.11. 離心機：轉速可達3000 rpm以上。</p> <p>2.2.12. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。</p> <p>2.2.13. 加熱器。</p> <p>2.2.14. 吸管輔助器 (Pipette aid) 或微量分注器。</p> <p>2.2.15. 微量吸管尖 (Tip)：10 μL、20 μL、200 μL 及1000 μL。</p> <p>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。</p> <p>2.2.17. 培養皿：已滅菌，內徑約9</p>	<p>一、「第一部：金黃色葡萄球菌之分離及其腸毒素之檢驗」主要依現有檢驗方法格式修正，其中「鑑別試驗」修正培養溫度為36°C，並增列「分離培養」中巴德派克培養基上生長非典型菌落之形態及「塗抹物 (Swab) 檢體之增菌培養」，另修正「計數」中「直接平板法菌數之計算」數據之有效位數至兩位，將第三位數字由四捨五入修正為四捨六入。</p> <p>二、「第二部：金黃色葡萄球菌之 real-time PCR 檢測」</p>

($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、30%過氧化氫溶液、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(glucose)、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(CaCl_2 , anhydrous)、甲苯胺藍O(toluidine blue O)、三羥甲基胺基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]及95%乙醇均採用試藥特級。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)、胨蛋白胨(proteose peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、聚蛋白胨(polypeptone)、胨蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3)、胰化蛋白胨(tryptone)及凝固酶血漿(兔來源，經EDTA處理)均採用微生物級。

2.4. 器具及材料

2.4.1. 吸管輔助器或微量吸管。

2.4.2. 吸管尖：已滅菌，10 μL 、20 μL 、200 μL 及1000 μL 。

2.4.3. 吸管：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。

2.4.4. 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。

2.4.5. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。

2.4.6. 試管：13 \times 100 mm、16 \times 150 mm、20 \times 150 mm或其他適用者。

2.4.7. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm 或以下之親水性濾膜。

2.4.8. 載玻片及蓋玻片：適用於染

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 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、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(Na_2HPO_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(CaCl_2 , anhydrous)、甲苯胺藍O(toluidine blue O)、三羥甲基胺基甲烷[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)、胨蛋白胨(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

主要係因即時聚合酶鏈反應器

「Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System」已停產，故修正為「Applied Biosystems Quant-Studio™ 5 Real-Time PCR System」，其餘依現有檢驗方法格式修正。

五、修正「參考文獻」及「檢驗流程圖」。

六、修正部分文字。

色及鏡檢者。

2.4.9. 接種針及接種環(直徑約3 mm): 鎳鉻合金, 鉑銥或鉻線材質, 或可拋棄式者。

2.4.10. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子: 可滅菌或可拋棄式者。

2.4.11. 塗抹曲棒: 可滅菌者, 或可拋棄式者。

2.4.12. 濾紙及褐色試藥瓶。

2.4.13. 研鉢、杵: 研磨試藥用。

2.4.14. 蠟筆或麥克筆: 塗寫、劃記載玻片時使用。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 3%過氧化氫溶液: 取30%過氧化氫溶液1 mL, 加蒸餾水9 mL, 混合均勻, 使用時新鮮配製。

2.5.2. 1%亞碲酸鉀溶液: 取亞碲酸鉀1 g, 溶於蒸餾水100 mL中, 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), 經無菌濾膜過濾, 冷藏備用, 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。

2.5.3. 含1%氯化鈉之0.02 M磷酸鹽緩衝溶液

溶液A: 取磷酸氫二鈉28.4 g及氯化鈉100 g, 溶於蒸餾水使成1000 mL。取50 mL, 加蒸餾水450 mL, 混合均勻。

溶液B: 取磷酸二氫鈉27.6 g及氯化鈉100 g, 溶於蒸餾水使成1000 mL。取10 mL, 加蒸餾水90 mL, 混合均勻。

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。

2.5.4. 溶菌素溶液: 取溶菌素2 mg, 溶於含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。

2.5.5. 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°C滅菌30分鐘。

2.5.6. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註1)

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°C滅菌30分鐘。

2.2.28.6. 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。

(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，取濾液供作初染劑。

(2) 革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀2 g及碘1 g，於研鉢研磨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，研磨至碘化鉀及碘完全溶解，移入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，洗液併入瓶中，加蒸餾水使成300 mL。

(3) 哈克氏複染液(複染劑)

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，作為複染原液。使用時，取複染原液10 mL，加入蒸餾水90 mL，供作複染液。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，倘購買成品時，應注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

2.5.7. 1 N氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉40 g，溶於蒸餾水使成1000 mL。

2.5.8. 70%乙醇溶液：取95%乙醇737 mL，加無菌蒸餾水使成1000 mL。

2.5.9. 稀釋液

2.5.9.1. 0.85%生理食鹽水：取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL中，分裝於容器中，以121°C滅菌15分鐘。

2.5.9.2. 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氫氧化鈉溶液調整pH值至7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，作為原液，冷藏備用。使用時，取原液1.25 mL，加入蒸餾水使成1000 mL，分裝於容器中，以121°C滅菌15分鐘。

2.5.9.3. 0.1%蛋白胍稀釋液(0.1% Peptone diluent)：取蛋白胍1 g，溶於蒸餾水1000 mL中，分裝於容

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°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%蛋白胍稀釋液(0.1% peptone diluent)：取蛋白胍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. 蛋白胍緩衝液(Buffered peptone water)：取蛋白胍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)

中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.2。

2.5.9.4. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)：取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉3.5 g及磷酸二氫鉀1.5 g，溶於蒸餾水1000 mL中，分裝於容器中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

2.6. 培養基之配製^(註2)

2.6.1. 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°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0.85%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1%亞碲酸鉀溶液10 mL，混合均勻，冷藏備用。

完全培養基(Complete medium)

將基礎培養基冷卻至45~50°C，加入EYT，以體積為95:5之比例混合均勻，倒入培養皿中。培養基倒入培養皿前，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。

2.6.2. 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

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°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(Na ₂ 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°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

infusion)	
胰蛋白胍 (protease peptone) 或聚蛋白胍 (polypeptone)	10 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

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

胰化酪蛋白胍 (trypticase peptone)	15 g
植物蛋白胍 (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：加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2，冷卻至50°C，分別取約20 mL倒入培養皿中，凝固後確定表面乾燥後使用。

斜面培養基配製方法：加熱沸騰溶解後，分別取約5 mL注入試管中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2，滅菌後製成斜面長度約4~5 cm，斜面底部之深度約2~3 cm之斜面培養基。

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

胰化酪蛋白胍 (trypticase peptone) 或 胰蛋白胍No.3 proteose peptone No.3)	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，加熱溶解後，分裝於試管中，以118°C滅菌10分鐘後立即冷卻，最終pH值為7.4±0.2。

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

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

胰化酪蛋白胍 (trypticase peptone)	15 g
植物蛋白胍 (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)

胰化酪蛋白胍 (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
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

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
甲苯胺藍 O (toluidine blue O)	0.083 g
三羥甲基氨基甲烷 [tris(hydroxymethyl)-aminomethane]	6.1 g
洋菜(agar)	10 g
蒸餾水	1000 mL

將三羥甲基氨基甲烷溶於蒸餾水 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，分裝於試管中，冷藏備用。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。

2.6.6. 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) 或 胰化蛋白朊 (tryptose)	17 g
植物蛋白朊 (phytone peptone)	3 g
氯化鈉	100 g
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖 (glucose)	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 ± 0.2。

註 2：亦可使用經確效認可之市售培養基。

2.7. 檢液之調製^(註3-5)

2.7.1. 固態檢體：將檢體適當切碎混勻後，取 50 g，加入稀釋液 450 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。

2.7.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎

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)

胰化酪蛋白朊 (trypticase peptone)	17 g
植物蛋白朊 (phytone peptone)	3 g
氯化鈉	100 g
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO 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 ± 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，

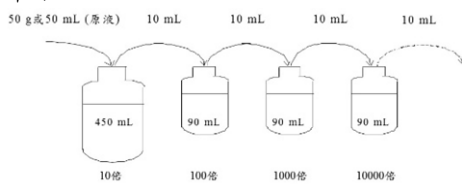
之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎混勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.7.3. 液態檢體：將檢體混勻後，取50 mL，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.7.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如於2~5°C，18小時內即可完全解凍者)；亦可使用較高溫度快速解凍(如45°C以下之水浴，15分鐘內可完全解凍者)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎混勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應先使成適當小塊，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.7.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等，經適當攪拌混勻後，取50 g，加入稀釋液450 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.7.6. 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100倍、1000倍、10000倍等系列稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。

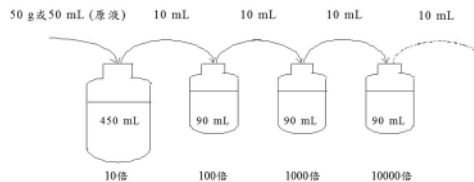


2.7.7. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管中，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，加入蛋白腓緩衝液5 mL，將試管蓋旋緊，於10秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達15公分) 50次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，取溶出液1 mL，置於內含TSB培養液(含10%氯化鈉及1%丙酮酸鈉) 10 mL之已滅菌試管中，供作檢液。或將塗抹棒之頭部置於內含TSB培養液(含10%氯化鈉及1%丙酮酸鈉) 10 mL之已滅菌試管，供作檢液。

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，添加蛋白腓緩衝液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. 除肉製品使用蛋白腓稀釋液外，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

註3：除肉製品使用0.1%蛋白胍稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液，其次為0.85%生理食鹽水。

註4：檢體總量不足50 g (mL)時，可依檢體量添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。

註5：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Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。

2.8. 鑑別試驗

2.8.1. 分離培養

2.8.1.1. 直接平板法 (Direct plate count method)

2.8.1.1.1. 將2.7節之系列稀釋檢液及(或)原液充分混合均勻。

2.8.1.1.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液0.1 mL，分別置入BP培養基中，每一檢液至少做二重複，共2片平板；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，分別置入3片BP培養基(如0.3 mL、0.3 mL及0.4 mL)，每一檢液至少做二重複，共6片平板。

2.8.1.1.3. 以已滅菌塗抹曲棒均勻塗抹乾後，倒置於36°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，呈灰黑色至黑色，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^(註6)。

註6：有時可能會見到非解脂菌株(nonlipolytic strains)，除沒有不透明環及透明環環繞外，其他外觀基本相同。另，從長期儲存之冷凍或脫水食品中分離之菌株，其黑色通常較典型菌落淺些，且外觀可能粗糙及質地乾燥。

2.8.1.1.4. 選取含20~200個菌落之平板^(註7)，鉤取可疑菌落分別接種於BHI培養液1 mL中，製成懸浮液，並同時接種於TSA培養基中，均以36°C培養18~24小時，供後續試驗

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^(註8)，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

使用。

註7：(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鈎取至少2個進行試驗。

(3) 必要時，平板之菌落可再行純化。

2.8.1.2. 最確數 (Most probable number, MPN) 計數法：預期檢體中只含低菌量金黃色葡萄球菌時使用。

2.8.1.2.1. 將2.7節之系列稀釋檢液及(或)原液充分混合均勻。

2.8.1.2.2. 分別吸取1 mL，接種於已裝有TSB培養液(含10%氯化鈉及1%丙酮酸鈉) 10 mL之試管中，每一檢液各接種3支(三階三支；為原液、10倍及100倍稀釋檢液時，每階試管所含檢體量分別為1、0.1及0.01 g (或mL)；為10倍、100倍及1000倍稀釋檢液時，每階試管所含檢體量分別為0.1、0.01及0.001 g (或mL))，於36°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。

2.8.1.2.3. 從2.8.1.2.2節每一支呈混濁(細菌之生長現象)之TSB培養液試管中各取一接種環菌量，劃線於BP培養基，於36°C培養45~48小時。

2.8.1.2.4. 由每片有細菌生長之平板中至少鈎取一個可疑菌落，依照2.8.1.1.4節，接種於BHI培養液及TSA培養基中，培養後供後續試驗使用。

2.8.1.3. 塗抹物(Swab)檢體之增菌培養

2.8.1.3.1. 將2.7.7節之檢液於36°C培養48±2小時，TSB培養液試管呈混濁(細菌之生長現象)時，鈎取一接種環菌量，劃線於BP培養基，於36°C培養45~48小時。

2.8.1.3.2. 自BP培養基上鈎取至少2個可疑菌落，依照2.8.1.1.4節，接種於BHI培養液及TSA培養基中，

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鈎取一個可疑菌落，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) 鈎取菌體：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斜面培養基上鈎取適量菌株，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斜面培養基上鈎菌，塗抹於載玻片上，加1~2滴3%過氧

培養後供後續試驗使用。

2.8.2. 革蘭氏染色(Gram stain)

(1) 適量0.85%生理食鹽水於載玻片上，以無菌接種針(或環)鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速加熱固定，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、成對或不規則之簇狀排列的球菌，不產芽孢。

2.8.3. 凝固酶試驗(Coagulase test)：吸取凝固酶血漿各0.5 mL，分別加至2.8.1節BHI增菌液0.2~0.3 mL中，於36°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，倘凝塊仍留在原處時，其凝固程度為4+，則可判定金黃色葡萄球菌為陽性。若其凝固程度為3+、2+或1+時，則應繼續進行下列輔助試驗。

2.8.4. 輔助試驗(Ancillary tests)

2.8.4.1. 觸酶試驗(Catalase test)：自2.8.1節之TSA培養基上鉤菌，塗抹於載玻片上，加3%過氧化氫溶液1~2滴，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。

2.8.4.2. 溶菌素敏感性試驗(Lysostaphin sensitivity test)：自2.8.1節之TSA培養基上鉤菌，置於裝有含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，加入氫溶液，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°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°C培養4小時，隨時觀察其顏色變化情形，

管(試管B)中，取溶菌素溶液0.1 mL，加入試管A (最終濃度為25 µg/mL)中，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中，作為對照組。將試管A及試管B於36°C放置不超過2小時，放置期間隨時觀察，當試管A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。

2.8.4.3. 厭氧下葡萄糖之利用 (Anaerobic utilization of glucose)：自2.8.1節之TSA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至少2.5 cm，於36°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。

2.8.4.4. 厭氧下甘露醇之利用 (Anaerobic utilization of mannitol)：自2.8.1節之TSA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至少2.5 cm，於36°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。

2.8.4.5. 熱安定型核酸分解酶試驗 (Thermostable nuclease test)：將2.8.1節BHI增菌液置於沸水中加熱15分鐘後，冷卻後吸取0.01 mL，滴入TDNA之凹洞後，置於含潮濕海綿之培養皿中，於36°C培養4小時，隨時觀察其顏色變化，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。

2.9. 判定

2.9.1. 金黃色葡萄球菌陽性者，應符合下表所列之結果。

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	無上述現象	+
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，鈎取可疑菌落至少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

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	無上述現象	+
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。

2.9.2. 由2.9.1節判定為金黃色葡萄球菌陽性者，依2.10節計算其菌數。

2.10. 計數

2.10.1. 直接平板法菌數之計算

2.10.1.1. 選取含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2.9節判定並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2.10.1.2或2.10.1.3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、計算比率(R)及求得各型態之金黃色葡萄球菌數，再將之相加總，以求得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

2.10.1.2. 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片或6片)中可疑菌落數總和並依下列公式計算菌數。其菌數之單位表示方式為CFU/g或CFU/mL，且金黃色葡萄球菌數結果表示時應將該數字第三位數字四捨六入(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)，使其有效數字為兩位。

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

$\sum a$ ：A稀釋倍數之所有平板之可疑菌落數總和

字為兩位。

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

$\sum a$ ：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。

$$\text{金黃色葡萄球菌數}(CFU/g \text{ 或 } CFU/mL)$$

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

$\sum a$ ：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 (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
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

V_A ：A稀釋倍數之所有平板之檢液總體積

A：稀釋倍數

R：比率

2.10.1.3. 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，並依下列公式計算菌數。

金黃色葡萄球菌數(CFU/g或CFU/mL)

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

$\sum a$ ：A稀釋倍數之所有平板之可疑菌落數總和

$\sum b$ ：B稀釋倍數之所有平板之可疑菌落數總和

V_A ：A稀釋倍數之所有平板之檢液總體積

V_B ：B稀釋倍數之所有平板之檢液總體積

A、B：稀釋倍數

R：比率

2.10.2. 最確數菌數之計算：由2.9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及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(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	MPN/mL	下限	上限	MPN/mL	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：最確數表適用之接種量為各階試管含檢體0.1、0.01及0.001 g(或mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

最確數(MPN/g或MPN/mL)=

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：

最確數MPN/g(MPN/mL)=

最確數表之最確數

第一階試管含檢體量×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)，推算出測試菌之

$$\text{最確數} = \frac{43}{1 \times 10}$$

= 4.3 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)，推算出測試菌

$$\text{之最確數} = \frac{43}{0.1 \times 10}$$

= 43 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

$$\text{出測試菌之最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10}$$

= 4.3×10² 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：鈎取經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. 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。

最確數表之最確數

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及0.01 g(或mL)，推算出測試菌

$$\text{之最確數} = \frac{43}{1 \times 10}$$

= 4.3 MPN/g (或MPN/mL)。

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

$$\text{試菌之最確數} = \frac{43}{0.1 \times 10}$$

= 43 MPN/g (或MPN/mL)。

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

$$\text{算出測試菌之最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10}$$

= 4.3×10^2 MPN/g (或MPN/mL)

2.11. 腸毒素之檢驗

2.11.1. 金黃色葡萄球菌腸毒素：鈎取經2.9節確認為金黃色葡萄球菌之單一菌落，接種於BHI培養液中，於36°C培養24小時後，培養液以900 \times g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。

2.11.2. 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。

附註：菌種鑑別亦可使用經確效認可之生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，如API ID 32 Staph、Vitek 2 GP等。

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及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)分析之方法。

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

2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System，或同級品。

2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。

2.2.3. 生物安全操作櫃：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：可達20000×g，並具4°C以下溫控功能者。

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及280 nm。

2.2.8. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(可達-20°C以下)功能。

2.2.9. 旋渦混合器。

2.2.10. 酸鹼度測定儀。

2.2.11. 天平：最大稱重量為2000 g者，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g者，靈敏度為1 mg。

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^(註1)

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*)

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^(註1)

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°C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°C)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。

<p>引子F：<u>LTnucF</u>，5'-AAATTACATA AAGAACCTGCGACA-3'</p> <p>引子R：<u>LTnucR</u>，5'-GAATGTCAT TGGTTGACCTTTGTA-3'</p> <p>探針P：<u>LTnucHP1</u>，5'-(FAM)-AAT TTAACCGTATCACCATCAATCG CTTT-(BHQ1)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小64 bp</p> <p>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：<i>entA</i>)</p> <p>引子F：<u>eta-F</u>，5'-TTTGGAAACG GTTAAAACGAATAAG-3'</p> <p>引子R：<u>eta-R</u>，5'-TTTCCTGTAAA TAACGTCTTGCTTGA-3'</p> <p>探針P：<u>eta-T</u>，5'-(FAM)-CTGTTC AGGAGTTGGATC-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小80 bp</p> <p>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：<i>entB</i>)</p> <p>引子F：<u>etb-F</u>，5'-AGGTGACTGCT CAAGAATTAGATTACC-3'</p> <p>引子R：<u>etb-R</u>，5'-AAGGCGAGTT GTTAAATTCATAGAGTT-3'</p> <p>探針P：<u>etb-T</u>，5'-(FAM)-AACTCG TCACTATTTGGTG-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小84 bp</p> <p>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：<i>entC</i>)</p> <p>引子F：<u>etc-F</u>，5'-GGCGATAAGTT TGACCAATCTAAATAT-3'</p> <p>引子R：<u>etc-R</u>，5'-AAGGTGGACT TCTATCTTCACACTTTT-3'</p> <p>探針P：<u>etc-T</u>，5'-(FAM)-TGTACA ACGACAATAAA-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小90 bp</p> <p>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：<i>entD</i>)</p> <p>引子F：<u>etd-F</u>，5'-CACAAGCAAG GCGCTATTTG-3'</p> <p>引子R：<u>etd-R</u>，5'-TCGGGAAAAT CACCCTTAACA-3'</p> <p>探針P：<u>etd-T</u>，5'-(FAM)-ATACA GCGCGGAAA-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小151 bp</p> <p>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：<i>entE</i>)</p> <p>引子F：<u>ete-F</u>，5'-CTTTGGCGGTA AGGTGCAA-3'</p>	<p>2.3.2. Real-time PCR用^(註2)</p> <p>2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針</p> <p>2.3.2.1.1. 金黃色葡萄球菌菌種鑑別基因(標的基因：<i>nuc</i>)</p> <p>引子F：5'-AAATTACATAAAGAA CCTGCGACA-3'</p> <p>引子R：5'-GAATGTCATTGGTTG ACCTTTGTA-3'</p> <p>探針P：5'-(FAM)-AATTTAACCGT ATCACCATCAATCGCTTT-(BHQ1)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小64 bp</p> <p>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：<i>entA</i>)</p> <p>引子F：5'-TTTGGAAACGGTAA AACGAATAAG-3'</p> <p>引子R：5'-TTTCCTGTAAATAACG TCTTGCTTGA-3'</p> <p>探針P：5'-(FAM)-CTGTTCAGGAG TTGGATC-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小80 bp</p> <p>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：<i>entB</i>)</p> <p>引子F：5'-AGGTGACTGCTCAAG AATTAGATTACC-3'</p> <p>引子R：5'-AAGGCGAGTTGTAA ATTCATAGAGTT-3'</p> <p>探針P：5'-(FAM)-AACTCGTCACT ATTTGGTG-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小84 bp</p> <p>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：<i>entC</i>)</p> <p>引子F：5'-GGCGATAAGTTTGAC CAATCTAAATAT-3'</p> <p>引子R：5'-AAGGTGGACTTCTAT CTTTCACACTTTT-3'</p> <p>探針P：5'-(FAM)-TGTACAACGAC AATAAA-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小90 bp</p> <p>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：<i>entD</i>)</p> <p>引子F：5'-CACAAGCAAGGCGCT ATTTG-3'</p> <p>引子R：5'-TCGGGAAAATCACCC TTAACA-3'</p> <p>探針P：5'-(FAM)-ATACAGCGCGG AAA-(MGB)-3'</p> <p>PCR增幅產物大小151 bp</p>	
--	--	--

引子R：ete-R，5'-ACCGTGGACCCTTCAGAAGA-3'

探針P：ete-T，5'-(FAM)-AGGCTTGATTGTGTTTCA-(MGB)-3'

PCR增幅產物大小60 bp

註1：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°C冷凍保存，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 QuantStudio™ 5 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及E型腸毒素)金黃色葡萄球菌參考菌株或其DNA(正反應對照組)及無菌去離子水(負反應對照組)。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 微量離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應盤。

註2：使用之吸管尖及微量離心管均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液之配製^(註3)

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3：Real-time PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA溶液之製備

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°C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^(註3)

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

2.6.1. 檢體增菌液之DNA溶液製備

自第一部2.8.1節增菌液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL微量離心管中，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

於沉澱物加入無菌去離子水1 mL，旋渦混合均勻，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液，於沉澱物加入無菌去離子水1 mL，旋渦混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸10分鐘，取出微量離心管，作為檢體DNA原液，依2.6.3節測定DNA濃度後，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微量離心管中，作為檢體DNA原液，依2.6.3節測定DNA濃度後，置於-20°C冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自第一部2.8.1節TSA培養基上鈎取一接種環之分離菌株，置入內含無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL微量離心管中，旋渦混合均勻，煮沸10分鐘，取出微量離心管，冷卻後以15000 ×g離心3分鐘，吸取上清液至另一已滅菌之1.5 mL微量離心管中，作為檢體DNA原液，依2.6.3節測定DNA濃度後，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.₂₆₀/O.D.₂₈₀比值作判斷，其比值宜介於1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗

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。依照

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

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

2.5節配製real-time PCR溶液於real-time PCR反應盤之反應孔中，以200×g瞬間離心後，移入real-time PCR反應器，依下列條件進行反應^(註4)。同時須執行正反應及負反應對照組。

步驟	溫度 (°C)	時間 (sec)
1. 最初變性	95	20
2. 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。

註4：上述反應條件不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

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。同時須比對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及E型腸毒素。

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. Tallent, S., Hait, J., Bennett, R. W. and Lancette, G. A. 2016. Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. Bacteriological Analytical Manual. [<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>].
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: 3071-3073.

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.₂₆₀/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 (°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

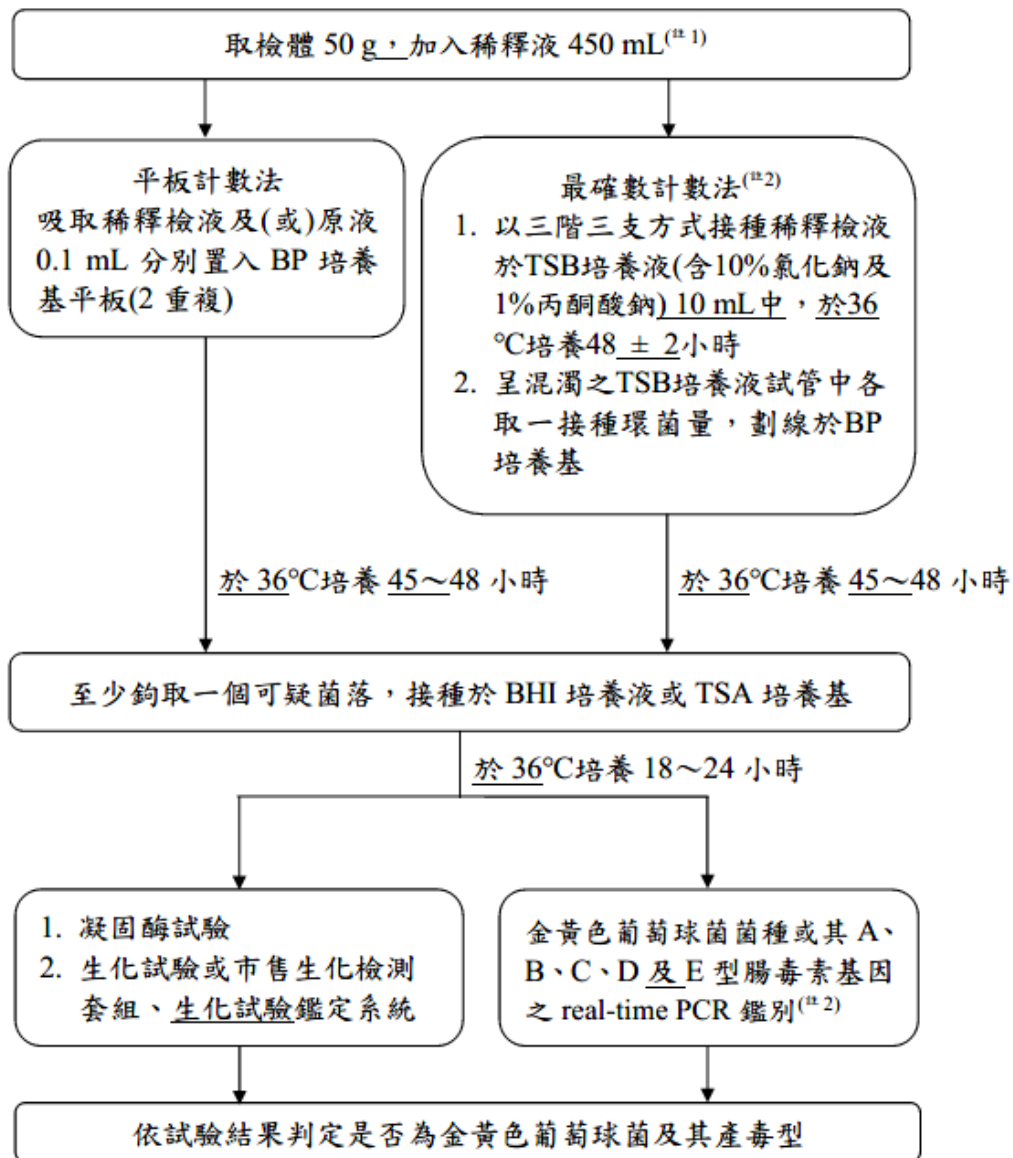
檢體DNA經real-time PCR反應後，直接從real-time PCR反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

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

<p>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. <i>J. Med. Microbiol.</i> 55: 273-277.</p>	<p>中含有金黃色葡萄球菌或其A、B、C、D、E型腸毒素基因。</p> <p>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。</p> <p>附註：第二部金黃色葡萄球菌之real-time PCR檢驗可視需要執行。</p> <p>參考文獻：</p> <p>1. Bennett, R. W. and Lancette, G. A. 2001. <u>Bacteriological Analytical Manual</u> Chapter 12 <i>Staphylococcus aureus</i>. US FDA.</p> <p>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. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 49(8): 3071-3073.</p> <p>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. <i>J. Med. Microbiol.</i> 55: 273-277.</p>	
---	---	--

檢驗流程圖(修正後)



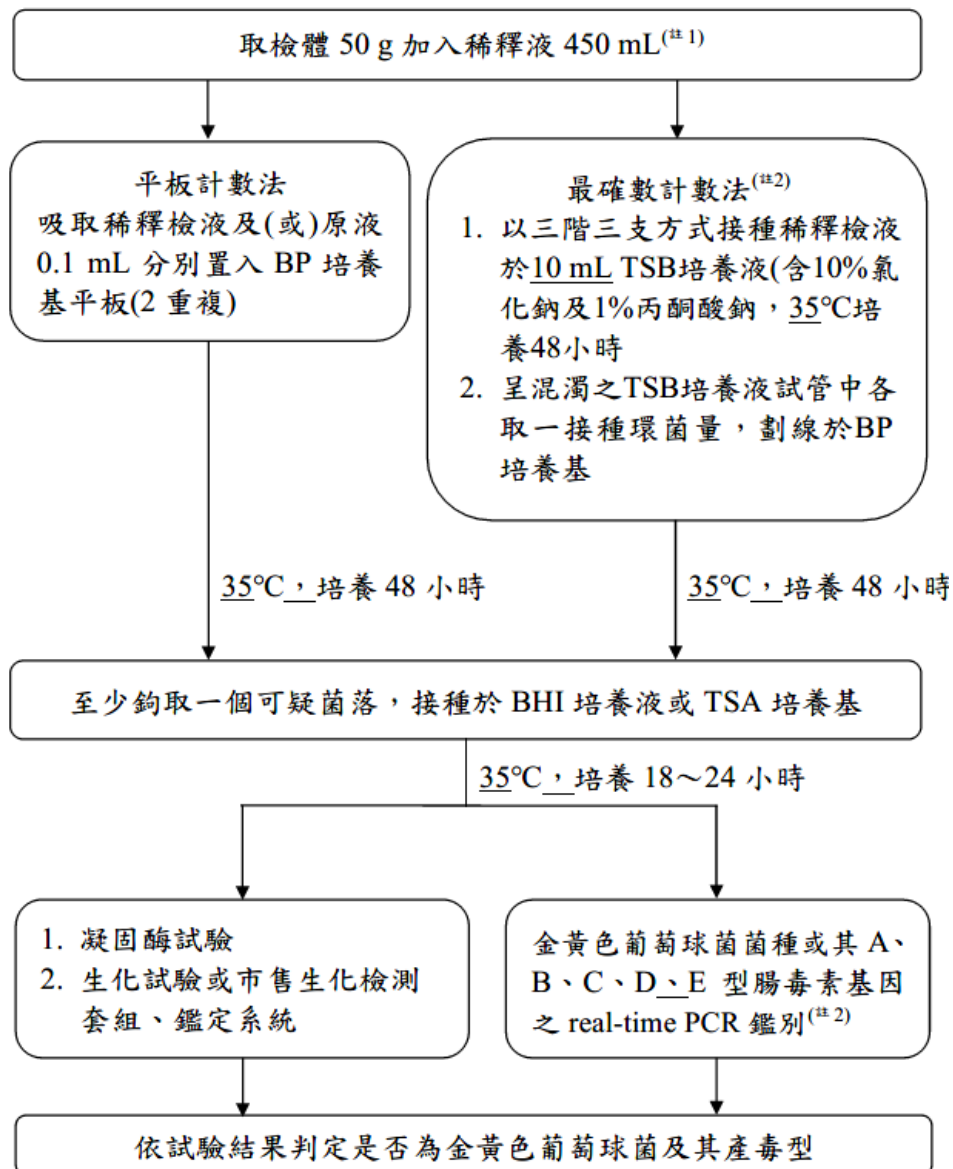
註1：除肉製品使用0.1%蛋白胨稀釋液外，其他檢體以磷酸鹽緩衝液作為稀釋液，其次為0.85%生理食鹽水。

註2：最確數(Most probable number, 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。

修正說明：檢驗方法由 RT-PCR 修正為 real-time RT-PCR。

檢驗流程圖(修正前)



註1：除肉製品使用蛋白胰稀釋液外，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。