

# 以酵素免疫套組偵測米飯中之金黃色葡萄球菌腸毒素

洪淑慎 黃翠萍 柯錫津

行政院衛生署藥物食品檢驗局

## 摘要

以四種市售酵素免疫套組偵測由中毒食品中分離之金黃色葡萄球菌菌株19株，其毒素型別以A型最多(89.5%)，C型次之(10.5%)，B型及D型則未檢出，且不同型式之酵素免疫套組間檢驗結果一致。而於滅菌之米飯中添加 $1.7 \times 10^3$  CFU/g金黃色葡萄球菌(產A型腸毒素)，在37°C培養6小時菌數即達 $2.5 \times 10^8$  CFU/g並可檢出0.11 ng腸毒素/g，而於22°C培養時則需24小時可檢出0.25 ng腸毒素/g，至於4°C貯存則延至48小時，亦未檢出腸毒素，菌數並維持於 $1.2 \sim 2.6 \times 10^3$  CFU/g。另以食品中常見之8株非金黃色葡萄球菌菌株測試四套市售套組，皆未產生交叉反應。

## 前言

由於金黃色葡萄球菌廣泛存在於人類之鼻部及皮膚處，若食品於製備或加工過程中衛生管理不當，極可能由金黃色葡萄球菌所產生之腸毒素(Staphylococcal enterotoxin, SE)引起食品中毒事件<sup>(1,2)</sup>，依據行政院衛生署八十年全年食品中毒案件統計資料<sup>(3)</sup>，在台灣地區亦以金黃色葡萄球菌所引起的中毒件數最高，佔細菌性食品中毒案件之48.9%。在由金黃色葡萄球菌引起之食品中毒事件中，以腸毒素A、B、C及D型(以下分別簡稱為SEA、SEB、SEC及SED)較為常見<sup>(4)</sup>，當人體食入後主要引起嘔吐及腹瀉等不適現象，其潛伏期一般為2~6小時<sup>(4,5)</sup>。

然而因飲食習性之不同，在國外雖有許多文獻探討肉製品、牛奶、糕餅類等食品中金黃色葡萄球菌菌數與腸毒素之相互關係<sup>(1,6-14)</sup>，但對於中國人為主食之米飯製品之研究卻相當缺乏。衛生署對民國八十年中毒原因食品判明案件中<sup>(3)</sup>，即以穀類及其加工食品(包括白飯、油飯及炒飯等)引起中毒之件數最高，佔20.5%，而本局於民國七十九年六月至民國八十年六月間抽購市售196件食品中，米飯製品檢出金黃色葡萄球菌之檢出率亦達16%，因此本研究乃選用米飯為培養基質，針對不同培養溫

度對金黃色葡萄球菌增殖及A型腸毒素之產生情形加以研究，及以食品中常見之8株非金黃色葡萄球菌菌株測試四套市售酵素免疫套組之交叉反應(cross-reaction)，並藉測試19株由中毒食品中分離之金黃色葡萄球菌菌株之腸毒素型別，以探討不同套組間檢驗結果是否一致。

## 材料與方法

### 一、材料

(一)試驗材料：米檢體購自超級市場，將重量比為1:1.2(w/w)之蓬萊米與水，經121°C加熱15分鐘殺菌處理後，即可作為外添加金黃色葡萄球菌試驗之培養基質。中毒食品檢體則由北區各縣市衛生局送驗。

(二)試藥：腸毒素標準品為純化之腸毒素A、B、C<sub>1</sub>及D購自Toxin technology, Wis., USA。Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate(Tween 20)購自美國Sigma公司，Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane及鹽酸溶液為德國Merck公司出品，氫化鈉及氫氧化鈉為試藥特級，和光，大阪，日本。

(三)微生物培養基：巴德派克培養基(Baird-Parker medium, BP)，腦心浸出培養液(Brain Heart Infusion broth, BHI)及胰化酪蛋白大豆培養基(Try-

Journal of Food and Drug Analysis.1993. 1(3)

pticase Soy Agar, TSA)皆購自Difco laboratories, Detroit, MI., USA。

#### (四)供試菌株

1. 金黃色葡萄球菌:分離自中毒案件中19株及購自食品工業菌種中心菌株編號分別為CCRC 13824, CCRC 13825, CCRC 13826, CCRC 13829, CCRC 13830及aFM 227, aFM 237, aFM 238, aFM 240, aFM 242(aFM 指由食品檢體中分離出之菌株)。

2. 其它菌株: *Shigella dysenteriae* CCRC 10264, *Escherichia coli* CCRC 10324, *Salmonella typhimurium* CCRC 10240, *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* CCRC 12924, *Staphylococcus intermedius* CCRC 12157, *Bacillus cereus* ATCC 1457, *Bacillus subtilis* ATCC 6051及*Pseudomonas aeruginosa*(NLFD 1325,分離自豬肉)。

#### (五)酵素免疫套組:

1. Toxin technology kit: staphylococcal enterotoxin SET-EIA, Toxin technology Co., Madison, Wis., USA。

2. TECRA Kit: staphylococcal enterotoxin visual immunoassay, Bioenterprises Pty. Ltd., Roseville, Australia。

3. Transia kits: KT-ST 724 及 KT-ST 725, Transia Co., Lyon, Franch。

(六)RPLA套組檢測金黃色葡萄球菌腸毒素型別之套組: Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D detection Kit by Reverse Passive Latex Agglutination, Denka seiken Co. LTD., Tokyo, Japan。

#### (七)儀器設備與器具

1. 分光光度計(Spectrophotometer): Milton roy spectronic 1201, Milton roy Co., Rochester, N.Y., USA。

2. EIA reader: MR 700 Microplate® reader, Dynatech medical products Ltd., Channel island, UK。

3. 微生物全自動鑑定儀: AMS VITEK Jr., VITEK system Inc., Mo., USA。

4. 離心機: J2-21 M/E centrifuge, Beckman instruments, Inc., CA., USA。

5. pH meter: 691 pH meter, Metrohm AG, Switzerland。

6. 振盪器(Belly dancer®): Stovall life science, Inc., N.C., USA。

## 二、方法

(一)標準曲線之製定:由於外加之金黃色葡萄球菌株所產腸毒素為A型,因此配製濃度為0.05, 0.1, 0.2, 0.35及0.5 SEA ng/ml之標準溶液,以KT-ST 724套組測試,繪圖方式以標準溶液濃度對相對吸光值繪圖。

(二)金黃色葡萄球菌外加試驗:將分離自中毒檢體之金黃色葡萄球菌菌株(已經凝固酶試驗及VITEK鑑定,且其產毒型式為A型)接種於TSA培養基,於37°C下培養18~24小時,取少許菌量接種於10 ml BHI培養液中,37°C培養18~24小時,再以BHI適當稀釋,並於600 nm下以分光光度計測其吸光值,使其吸光值介於0.05~0.06時,取0.1ml稀釋菌液,添加於已滅菌之50g米飯(相當添加菌量為10<sup>3</sup>CFU/g)中,然後貯存於4°C, 22°C及37°C,分別於6, 12, 24, 36, 及48小時進行取樣,並測試金黃色葡萄球菌菌數、腸毒素含量及pH值,每一取樣皆做二重複。

(三)金黃色葡萄球菌菌數之計數及鑑定:依照中國國家標準<sup>(15)</sup>CNS 12542, N6214的方法進行檢驗,在35°C培養45~48小時後,挑取可疑菌落進行鏡檢及凝固酶試驗,同時以微生物全自動鑑定儀鑑定菌株種類,並予以計數。

(四)檢體前處理:稱取米飯檢體50 g置於250 ml離心瓶中,加入50 ml蒸餾水,振搖10分鐘後,於4°C下採8000 rpm高速離心15分鐘,取上層液即可以KT-724酵素免疫套組進行腸毒素分析。

(五)菌株毒素型別之鑑定:將菌株接種於TSA並連續活化兩次,取少許菌量接種於BHI培養液中,於35~37°C培養過夜,以3000 rpm離心15分鐘,套組測試方法為TECRA套組取已離心之上層BHI培養澄清液後,再依酵素免疫套組操作步驟(3)進行測試,而SET-EIA、KT-ST 724及KT-ST 725套組則分別取0.4 ml已離心之上層BHI培養澄清液與20 μl NRS(normal rabbit serum)溶液於室溫下反應30分鐘,加入3.6 ml Tris-NaCl-Tween(0.01 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.5)溶液將之稀釋10倍後,以KT-ST 724及KT-ST 725套組依下述酵素免疫套組操作步驟(1)及(2)進行腸毒素分析。SET-EIA套組則取4 ml稀釋液如同酵素免疫套組操作步驟(4)進行分析。

#### 1. 酵素免疫套組操作步驟:

(1)KT-724套組:依KT-724操作手冊所述行之,分別取500 μl腸毒素標準溶液(陽性對照組, positive control)、洗液(陰性對照組, negative control)及濃度適當之檢液,置於室溫中反應15分鐘,以洗液清洗二次後瀝乾,每管分別加入500 μl



Journal of Food and Drug Analysis.1993. 1(3)

抗體-酵素結合體(enzyme conjugate)反應5分鐘，再以洗液清洗5次後瀝乾，加入500  $\mu$ l 酵素基質，反應30分鐘後，加入500  $\mu$ l 終止反應溶液，以分光光度計450 nm波長測其吸光值。以上反應皆宜加以振搖並在室溫下進行反應。

(2)KT-725套組：依KT-725操作手冊所述行之，將sticks分別置20 ml腸毒素標準溶液(陽性對照組)、洗液(陰性對照組)及濃度適當之檢液中反應2小時，以洗液清洗4次(每次5分鐘)，加入適量抗體-酵素結合體溶液反應30分鐘，再以洗液加以清洗4次後，加入適量dimethylformamide酵素基質溶液反應15分鐘，再以蒸餾水清洗後瀝乾，觀察結果。以上反應皆宜加以振搖並在室溫下進行反應。

(3)TECRA套組：依TECRA套組操作手冊所述行之，室溫下以洗液清洗微滴盤孔(microtitre plate)並放置10分鐘，倒出洗液後瀝乾，分別取200  $\mu$ l 腸毒素標準溶液(陽性對照組)，套組所附之陰性對照組及已先與套組所附之sample additive作用之濃度適當檢液，覆上塑膠薄膜置35~37°C反應2小時，以洗液清洗3次，瀝乾後加入200  $\mu$ l 抗體-酵素結合體溶液於室溫下反應1小時，再以洗液清洗5

次，瀝乾後加入200  $\mu$ l 酵素基質溶液反應30~45分鐘(直至陽性對照組之吸光值>1.0)，加入20  $\mu$ l 終止反應溶液，以EIA reader 414±10 nm測試(參考波長為490±10 nm)。

(4)SET-EIA套組：依SET-EIA套組操作手冊所述行之，將結合有anti-SET之塑膠球(plastic ball)及4個對照塑膠球(上被覆NRS)放入管中，以NaCl-Tween洗液(含0.14M NaCl及0.1% Tween 20)清洗，分別加入4 ml濃度適當之腸毒素標準溶液(陽性對照組)及已經前處理之檢液，置室溫下以100rpm振盪反應4小時後，以洗液清洗，再將各球放入相對應試管內，分別加入0.5 ml anti-SET抗體-酵素結合體反應2小時，再以洗液清洗塑膠球三次並瀝乾水份，加入1 ml p-nitrophenyl phosphate之酵素基質反應60分鐘，加入100 ml 反應終止液(2 N NaOH)及1 ml 蒸餾水，以分光光度計405 nm波長測其吸光值，以上反應皆於室溫下進行。

2. RPLA套組檢測金黃色葡萄球菌腸毒素型別之操作方法：依RPLA套組操作手冊所述行之，分別取25  $\mu$ l 腸毒素標準溶液(陽性對照組)及已經3000 rpm離心15分鐘之上層BHI培養澄清菌液，置

**Table 1.** Types of staphylococcal enterotoxins isolated from outbreaks of food poisoning

Sample No.	Source of Isolation	Diagnostic kits				
		SET-EIA	KT-ST 725	KT-ST 724	TECRA	RPLA
1.	hamburger	SEA	SEA	+	+	SEA
2.	hamburger	SEA	SEA	+	+	SEA
3.	hamburger	SEA	SEA	+	+	SEA
4.	sandwich	SEA	SEA	+	+	SEA
5.	sandwich	SEA	SEA	+	+	SEA
6.	sandwich	SEA	SEA	+	+	SEA
7.	chocolate cake	SEC	SEC	+	+	SEC
8.	cake	SEA	SEA	+	+	SEA
9.	cake	SEA	SEA	+	+	SEA
10.	chocolate cake	SEC	SEC	+	+	SEC
11.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
12.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
13.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
14.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
15.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
16.	lunch box	SEA	SEA	+	+	SEA
17.	fried egg	SEA	SEA	+	+	SEA
18.	cooked meat	SEA	SEA	+	+	SEA
19.	cooked rice	SEA	SEA	+	+	SEA

<sup>+</sup>“+” : positive reaction.

**Table 2.** Growth of *S. aureus* and production of enterotoxin A in cooked rice at different incubation temperature<sup>a</sup>

Incubation Time (hr)	Cell number (CFU/g)			SEA(ng/g)			pH		
	4°C	22°C	37°C	4°C	22°C	37°C	4°C	22°C	37°C
6	1.2×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>8</sup>	N.A. <sup>b</sup>	N.A.	0.11	6.59	6.54	6.49
12	2.4×10 <sup>3</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>	7.7×10 <sup>9</sup>	N.A.	N.A.	1.11	6.53	6.50	6.47
24	2.6×10 <sup>3</sup>	1.6×10 <sup>9</sup>	5.7×10 <sup>10</sup>	N.A.	0.25	2.18	6.55	6.52	6.40
36	2.0×10 <sup>3</sup>	1.4×10 <sup>11</sup>	3.5×10 <sup>12</sup>	N.A.	0.81	6.34	6.59	6.47	6.40
48	2.5×10 <sup>3</sup>	2.4×10 <sup>12</sup>	1.1×10 <sup>14</sup>	N.A.	2.49	23.00	6.54	6.54	6.33

<sup>a</sup>Inoculation is 1.7×10<sup>3</sup> CFU/g at pH=6.66.

<sup>b</sup>N. A., Data are not available.

於微量V型孔洞中，再加入25 μl SET-RPLA(A、B、C、D)之感受性試劑與之作用，並另取套組所附25 μl之未感受性試劑(陰性對照組)與25 μl腸毒素標準溶液作用，於室溫下靜置18~20小時後觀察，當中心部有紅點沈降時為負反應，反之則為正反應。

### 結果與討論

自八十年七月至八十一年六月間送驗本局之中毒食品中分離之金黃色葡萄球菌菌株19株，以酵素免疫套組測試結果列於表一，檢出腸毒素型別以A型為主(89.5%)，C型次之(10.5%)，B型及D型則未檢出，而四種不同型式之酵素免疫套組間及RPLA方法之檢驗結果一致。至於七十九年七月至八十年六月送驗至本局之196件食品中毒檢體，檢出42件產毒菌株，以RPLA測試毒素型別，亦以A型為主(80.3%)。

由表一中得知金黃色葡萄球菌腸毒素所引起之食品中毒事件，其毒素型別多以A型為主，因此本研究乃選用米飯為培養基質，針對不同培養溫度對金黃色葡萄球菌(產毒型別為A)增殖及其產毒情形加以探討。圖一為以KT-724套組測試腸毒素A型之標準曲線，當SEA濃度為每毫升0.05~0.5 ng，其線性迴歸係數為0.989。表二中添加1.7×10<sup>3</sup> CFU/g金黃色葡萄球菌至已滅菌之米飯中，在4°C貯藏溫度下，培養至48小時菌數仍維持原添加菌量，且SEA亦未檢出。於22°C貯藏24小時菌數已達10<sup>9</sup> CFU/g，並可測出0.25 ng SEA/g，且毒素含量亦隨培養時間之延長而增加，培養溫度為37°C時，菌數增加更為急遽，6小時即可達2.5×10<sup>8</sup> CFU/g，並可檢出0.11 ng SEA/g。A型腸毒素產生之最適pH值範圍為6.5~7.3<sup>(1)</sup>，實驗中選用米飯當培養基質

(pH=6.6)，對腸毒素之產生並不會造成抑制作用，而在貯藏期間pH值雖隨培養溫度上升而有下降之趨勢，但其數值變化不大，皆介於6.3~6.5之間。

葡萄球菌與其它雜菌共存時，前者並非具有極高的競爭性<sup>(12,13)</sup>，因而培養基質採用已滅菌之米飯可避免雜菌抑制金黃色葡萄球菌之生長，不過雜菌之存在並不一定會影響腸毒素之產生，Herten等人<sup>(10)</sup>之研究顯示當肉品中金黃葡萄球菌菌數達6×10<sup>6</sup>~2×10<sup>7</sup> CFU/g時，即使存有與金黃色葡萄球菌菌數相當之其它雜菌，如：*Pseudomonas* spp.，腸毒素亦可被檢出。腸毒素之產生除受水活性、pH值、溫度及金黃色葡萄球菌菌株之影響外<sup>(13)</sup>，腸毒素之產生需要特殊基質如胺基酸、維生素、礦物質等，因而許多金黃色葡萄球菌菌株，在食品中雖然可以生長良好，但卻無法產生毒素<sup>(1)</sup>，亦即不同食品中金黃色葡萄球菌之生長與其產毒並沒有直接相關<sup>(8)</sup>，如牛奶中金黃色葡萄球菌菌數達10<sup>7</sup>CFU/g，或者火腿中菌數達10<sup>8</sup>CFU/g時即可檢出腸毒素<sup>(14)</sup>，而豆類食品在培養48小時後，即使菌數已達10<sup>9</sup>CFU/g，亦只有檢出微量腸毒素<sup>(8)</sup>。由表二結果顯示金黃色葡萄球菌可於米飯中生長良好，因此一般以米飯為主之食品或餐盒，若製備過程遭受金黃色葡萄球菌污染且長時間置於室溫(22°C左右)或保溫狀態，金黃色葡萄球菌即可快速增殖並產生毒素，而引起食品中毒，事實上大多數由金黃色葡萄球菌引起之食品中毒之主因即為衛生管理不佳或貯藏溫度不當所致<sup>(1)</sup>。因此若能將非立即食用之米飯食品，置於冷藏(4°C)狀態下，較能維持食品之安全與衛生。

酵素免疫法係利用抗體與抗原之特有結合反應，而有極高之專一性，相當適合做為例行檢驗之方法<sup>(16)</sup>，然而檢液中若含有某些成分亦可與抗體作用，則將產生交叉反應，造成定性及定量上的干



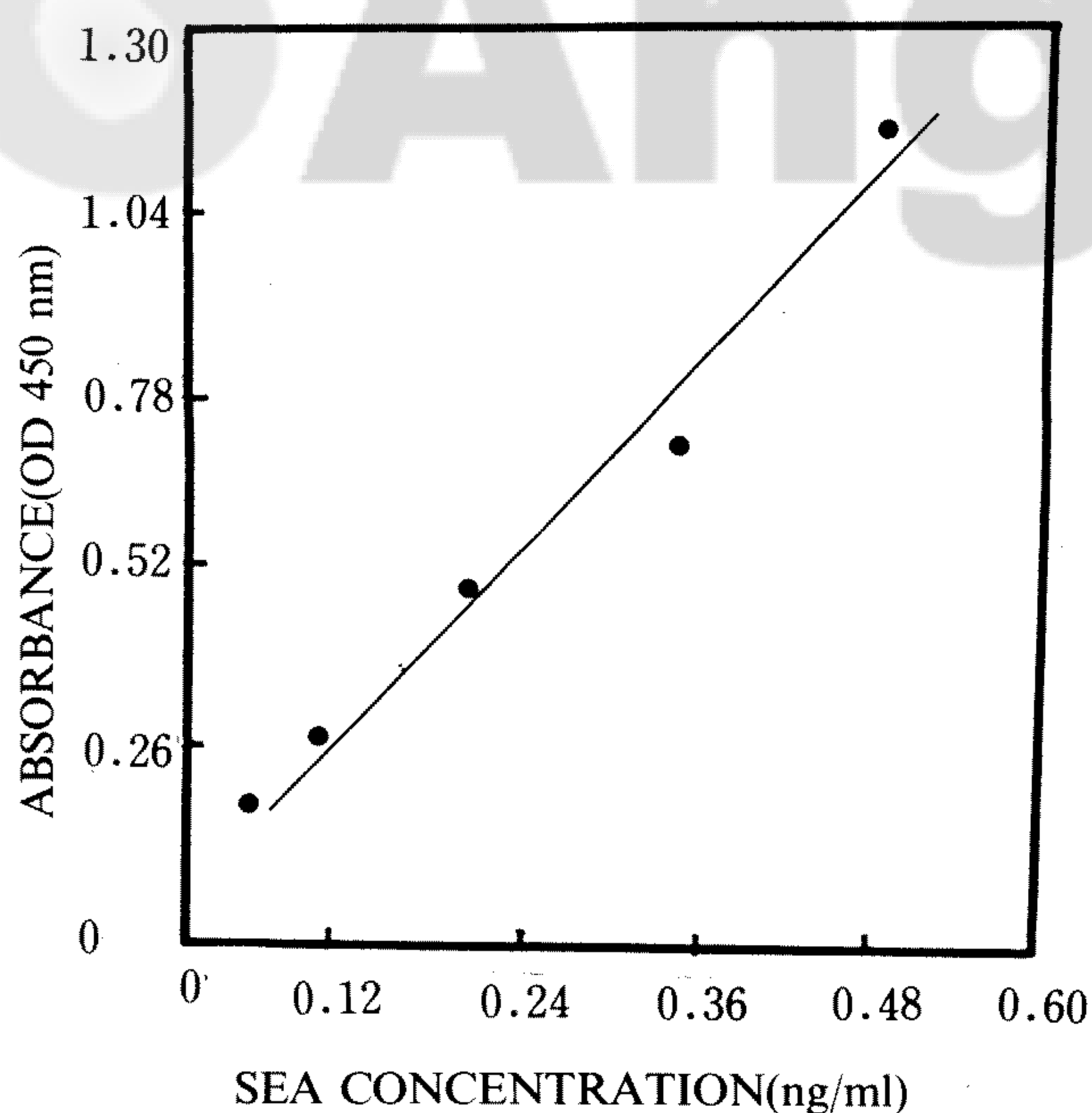


Figure 1. Standard curve for SEA detection using enzyme immunoassay kit KT-724.

擾<sup>(17)</sup>。葡萄球菌腸毒素依血清反應之不同可分為A、B、C、D及E等五種型式，其中C型又可分為C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>及C<sub>3</sub>，這些腸毒素皆為水溶性，分子量介於26,000~29,000 daltons之蛋白質，能耐高溫且其生物活性亦很相近，其中SEA, SED及SEE的胺基酸組成相似，而SEB及SEC則較為相近，不過這些特性可藉相對應之抗體加以區分<sup>(2)</sup>。因此本研究亦利用EIA套組檢測金黃色葡萄球菌株及部分例行檢驗常見之菌株，以觀察是否產生腸毒素或相似成份，而造成交叉反應之干擾現象。表三中除採用酵素免疫套組亦使用RPLA輔助檢驗，四套市售酵素免疫套組所使用之抗體形式雖有 polyclonal, monoclonal 或者兩者併用，且分別吸附於4種不同型式之塑膠球、棒、管及微滴盤孔 (polystyrene ball, stick, tube及 microtitre plate) 上，但其反應機制相同，皆屬於三明治 (sandwich) 型之酵素免疫套組，結果顯示SET-EIA與RPLA之結果完全一致，皆可區分SEA, SEB, SEC及SED或者同時偵測2種腸毒素，而KT-ST 725測試菌株CCRC 13825與

Table 3. Detection of staphylococcal enterotoxin produced by microorganism using commercial EIA kits

Strain	Diagnostic kits				
	SET-EIA	KT-ST 725	KT-ST 724	TECRA	RPLA
<i>Staphylococcus aureus</i>					
CCRC 13824	SEA	SEA	+ <sup>a</sup>	+	SEA
CCRC 13825	SEA, SEB	SEB	+	+	SEA, SEB
CCRC 13826	SEC	SEC	+	+	SEC
CCRC 13829	SED	SED	+	+	SED
CCRC 13830	- <sup>b</sup>	SEE	+	+	-
aFM 237	-	-	-	-	-
aFM 238	SEA, SAB	SEB	+	+	SEA, SEB
aFM 240	-	-	-	-	-
aFM 242	SEB	SEB	+	+	SEB
<i>S. intermedius</i> CCRC 12157	-	-	-	-	-
<i>S. hyicus</i> subsp.					
<i>chromogenes</i> CCRC 12924	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 1457	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> CCRC 10240	-	-	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> CCRC 10264	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CCRC 10324	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> NLFD 1325	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>“+”: positive reaction.

<sup>b</sup>“-”: negative reaction.

Journal of Food and Drug Analysis.1993. 1(3)

CCRC aFM 238時無法測出SEA,推測可能此套組對SEA靈敏度較低所致,但對於CCRC 13830菌株以ST-KT 725套組可檢測出SEE,而SET-EIA與RPLA套組則無法檢出。至於KT-ST 724與TECRA套組,其結果亦與SET-EIA套組一致,但由於對SEA、SEB、SEC<sub>1</sub>、SEC<sub>2</sub>、SEC<sub>3</sub>、SED及SEE等七種腸毒素皆可反應,因此無法鑑定腸毒素型別,而且當有兩種或兩種以上之腸毒素同時存在時,亦無法定量腸毒素。

腸毒素之產生除主要源自金黃色葡萄球菌外,如*S. intermedius*及*S. hyicus*亦可能產生腸毒素<sup>(2)</sup>,不過此次所選之兩株菌株(表三)並未產生腸毒素,其它食品中常見菌株*B. subtilis*、*B. cereus*、*S. typhimurium*、*S. dysenteriae*、*E. coli*及*P. aeruginosa*以四套EIA套組測試皆無交叉反應產生。不過, Park等人<sup>(8)</sup>以TECRA套組測試食品中非金黃色葡萄球菌株時,卻發現*Enterobacter cloacae*、*Proteus mirabilis*及*Serratia marcescens*有明顯的偽陽性(false-positive)反應,而*P. aeruginosa*與*E. agglomerans*之414 nm OD值則介於陰性對照值與陽性對照值之間,其結果顯示當食品中存有一些非金黃色葡萄球菌時,以TECRA套組測試時極可能造成腸毒素檢驗上的干擾,此種干擾可因受測菌預先加熱而除去,因此若於食品中實際應用酵素免疫套組偵測腸毒素,除樣品予以適當的前處理外,亦宜考慮非金黃色葡萄球菌株之干擾及所選用測試套組之適用性等因素,以減少檢驗上之誤差。

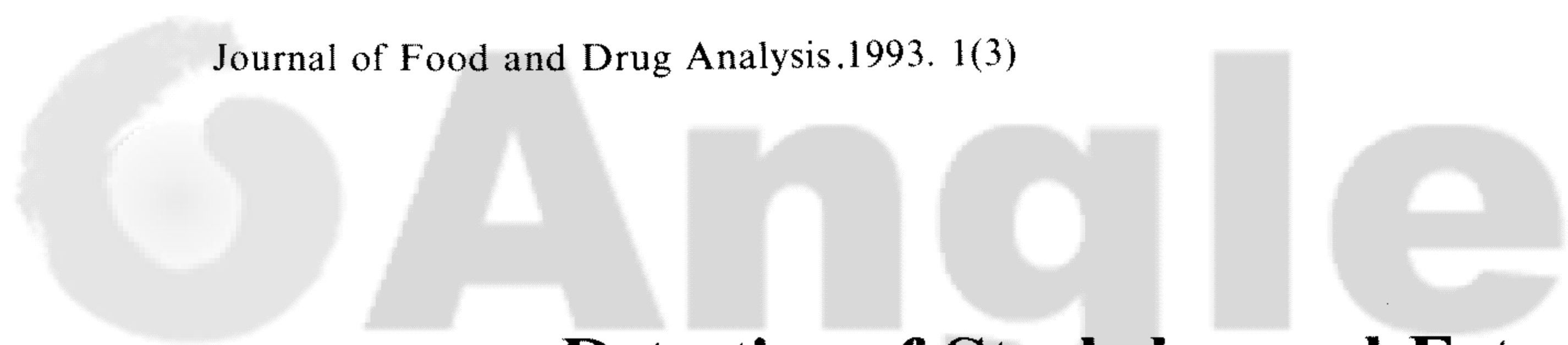
### 參考文獻

- Hassan, G., Tsai, W.Y.J. and Bullerman, L.B. 1991. Growth and production of enterotoxins A and D by *Staphylococcus aureus* in salad bar ingredients and clam chowder. J. Food Prot. 54:844-847.
- Bergdoll, W. S. 1989. Chapt. 31. *Staphylococcus aureus*. In "Foodborne Bacterial Pathogens". pp.463-523. Michael, P. D.(ed). New York: Marcel Dekker Inc. U.S.A.
- 行政院生署.1992.民國80年台灣地區食品中毒發生狀況.pp.5-11.行政院衛生署.台北.
- Lapeyer, C., Janin, F. and Kaveri, S. V. 1988. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C<sub>1</sub> and D in food samples. Food Microbiol. 5:25-31.
- Bennett, R. W. 1984. In "Bacteriological analytical manual". 6th ed., pp.15.01-15.11. U. S. Food and Drug Administration, U. S. A.
- Lopes, H. R., Noleto, A. L. S. and Bergdoll, M. S. 1991. Production of staphylococcal enterotoxins A, D, and E by sac culture. J. Food Prot. 54:650-652.
- Shelef, L. A., Wang, Z-L. and Udeogu, A. C. 1990. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A production in food containing polyphosphates. J. Food Safety 10:201-208.
- Neumayr, L. and Kramer, J. 1990. Production of enterotoxin A and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in legumes. Int. J. Food Microbiol. 10:225-234.
- Gomez-Lucia, E., Goyache, J., Orden, J.A., Domenech, A., Hernandez, F. J., Ruiz-Sanra-Quiteria, J. A. and Suar, G. 1990. Influence of temperature of incubation on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in homemade mayonnaise. J. Food Prot. 53:386-390.
- Herten, B., Board, R. G. and Mead, G. C. 1989. Conditions affection growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* on temperature-abused chicken meat. Letters in Appl. Microbiol. 9:145-148.
- Gomez-Lucia, E., Goyache, J., Blanco, J. L., Garayzabal, J. E. F., Orden, J.A. and Suarez, G. 1987. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in homemade mayonnaise prepared with different pH values. J. Food Prot. 50:872-875.
- Hirooka, E. Y., De Salzberg S. P. C. and Bergdoll, M. S. 1987. Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. J. Food Prot. 50:952-955.
- Notermans, S. and Otterdijk, R. L. M. 1985. Production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* in food. Int. J. Food Microbiol. 2:145-149.
- Noleto, A. L. and Bergdoll, M. 1980. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. Appl. Environ. Microbiol. 39:1167-1171.

Journal of Food and Drug Analysis.1993. 1(3)

15. 經濟中央標準局.1986.食品微生物之檢驗法—金黃色葡萄球菌之檢驗,中國國家標準。總號12542.類號N 6214.台北市.
16. Candlish, A. A. G. 1991. Immunological methods in food microbiology. Food Microbiol. 8:1-14.
17. Koper, J. W., Hagenaars, A. M. and Notermans, S. 1980. Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B in culture filtrates and foods. J. Food Safety 2:35-45.
18. Park, C. E., Akhtar, M. and Rayman, M. K. 1992. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit(TE-CRA)for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol. 58:2509-2512.





## Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Rice Using Enzyme Immunoassay Kits

SHU-SHEN HUNG, TSUEY-PING HUANG AND HSI-CHIN KO

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan.*

### ABSTRACT

Four commercial enzyme immunoassay kits specific for the detection of staphylococcal enterotoxins(SE) were used to examine *Staphylococcus aureus* strains isolated from samples of food poisoning outbreaks. Results showed that 89.5% and 10.5% of the strains tested could produce SEA and SEC, respectively. No SEB or SED producing strains were observed. A *S. aureus* strain which produces SEA was inoculated into some sterilized cooked rice at a concentration of  $1.7 \times 10^3$  CFU/g. After 6 h incubation at  $37^\circ\text{C}$ ,

cell concentration reached  $2.5 \times 10^5$  CFU/g and SEA reached 0.11 ng toxin/g. When the rice sample was kept at  $4^\circ\text{C}$  for 48 h, cell growth and toxin production was not detected. Using eight strains of non-*S. aureus* bacteria which may be commonly found in foods, was used as control to test the detection specificity of the four commercial available enzyme immunoassay kits. Results showed that no cross-reaction had occurred indicating that the kits are highly specific for enterotoxin detection.

**Key words** : Staphylococcal Enterotoxins, *Staphylococcus aureus*, Enzyme Immunoassay, Cross-reaction.