

# 109年度檢驗技術教育訓練

## 食品中單核球增多性李斯特菌 之分離與鑑別

報告人：葉民煉

研究檢驗組食品生物科

109.09.29



衛生福利部  
食品藥物管理署  
Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

# 大綱

---

- 認識單核球增多性李斯特菌
- 單核球增多性李斯特菌之食品衛生標準
- 單核球增多性李斯特菌之檢驗方法
  - 配製稀釋液、培養基
  - 調製檢液與增菌培養
  - 選擇性增菌培養與分離
  - 鑑定試驗及判定

---

# 認識單核球增多性李斯特菌

# 單核球增多性李斯特菌之食品中毒案

□ 環境適應性強(乾燥、高溫、酸性環境、鹽及酒精具耐受性)，廣泛存於自然界中，常發現於土壤、腐生植物和許多哺乳動物的糞便中，約5%健康成人糞便中可分離出這種菌，為人畜共通傳染病源之一。李斯特菌中毒雖不多見，但死亡率高達30~35%。

## □ 菌種特性

- 1.革蘭氏陽性桿菌
- 2.具有鞭毛
- 3.兼性厭氧菌
- 4.不會形成芽胞
- 5.生長溫度3~45°C，最適溫度30~37°C，特別是在冷藏溫度4~10°C仍可繁殖
- 6.加熱至72°C以上可殺死

## □ 發生原因

- 1.主要傳染途徑以食品為媒介，食入曾受李斯特菌感染的食品。
- 2.易受感染食品包括生菜沙拉、即食食品、加工肉類製品、熱狗、乳酪、奶油、沙拉醬及未經適當殺菌的牛奶及冰淇淋等。
- 3.經常接觸牲畜的工作者，例如獸醫、畜牧業、寵物飼養者、禽鳥飼養者。
- 4.生食者與實驗室工作人員也屬於感染高危險群。

<http://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=1953>

# 單核球增多性李斯特菌中毒案件

## 孕媽生食染李斯特菌 女嬰出生呼吸急促住院

最新更新：2020/09/01 14:56

(中央社記者陳偉婷台北1日電) 衛生福利部疾病管制署今天公布，北部一名女嬰感染李斯特菌症，一出生就因呼吸急促住院。疫調發現，女嬰母親沒有症狀，但懷孕期間曾經吃生菜和生魚片，可能因此母子垂直感染。

李斯特菌症感染後的病情嚴重程度因感染者的免疫狀況而異，免疫力正常者不易受感染，或感染後僅有腹瀉、噁心、嘔吐等症狀。年長者、免疫力低下者、孕婦及新生兒為高風險群，比較可能出現侵襲性感染，如菌血症、敗血症等，致死率約3成。



### 台灣東部地區市售即食魚貝類食品 李斯特菌污染之調查

90年5~10月抽驗生魚片、魚卵、生蠔、鹹蜆、熟章魚、熟小卷、涼拌海蜇皮及生蝦仁等73件，檢出陽性者8件(生魚片4件、熟章魚2件、魚卵及熟小卷各1件)，**檢出率11%**。

表一、台灣東部地區市售即食魚貝類食品李斯特菌陽性之情形

檢體種類	檢體數/陽性件數(%)			合計
	宜蘭縣	花蓮縣	台東縣	
生魚片	7/0	10/2(20.0)	12/2(16.7)	29/4(13.8)
魚卵	2/0	5/1(20.0)	3/0	10/1(10.0)
生蠔	5/0	2/0	1/0	8/0
鹹蜆	1/0	3/0	4/0	8/0
熟章	6/1(16.7)	4/1(25.0)	2/0	12/2(16.7)
熟小卷	0/0	1/1(100)	0/0	1/1(100)
涼拌海蜇皮	4/0	0/0	0/0	4/0
生蝦仁	0/0	0/0	1/0	1/0
合計	25/1(4.0)	25/5(20.0)	23/2(8.7)	73/8(11.0)

# 單核球增多性李斯特菌中毒案件

ETtoday新聞雲 > ETtoday健康雲

文／林慧淳 圖／Pixabay

2019年12月29日 12:40

## 美爆「包裝水煮蛋染李斯特菌」致1死 專家：冷藏即食品4招自保

水煮蛋是老少咸宜、補充蛋白質和增肌好食物，不過近來美國卻爆出包裝水煮蛋含李斯特菌疫情，有5州共7人感染，其中4人住院，在德州更造成1人死亡。由於李斯特菌可能導致嚴重感染，美國疾病管制與預防中心（CDC）已勒令回收Almark食品公司所生產的塑膠包裝水煮蛋，由於餐廳可能用水煮蛋做成雞蛋沙拉等各種產品，CDC也建議免疫力較差的人先不要吃這類食品。



## 【食物安全】韓國金菇受李斯特菌污染 造成4死36不適全美急回收

晴報  
SKY POST

發佈時間: 2020/03/13 撰文: 鄭禮賢

《CNN》引述美國聯邦食品暨藥品管理局資料報道，由新鴻食品公司（Sun Hong Foods）生產的一款金菇食品懷疑含有李斯特菌（Listeria），於本周一（9日）已被當局全面回收，惟食品已導致4名美國人死亡，36人中毒入院。



據當局公開資料可見，該款金菇包裝上半部呈透明、下半部則為綠色並印有「ENOKI MUSHROOM」及韓文字眼，並標名「產自韓國」（Product of Korea）。美國疾病管制與預防中心（CDC）呼籲國民避免食用該款金菇，即使已食用一半而未覺身體不適都不應再食。

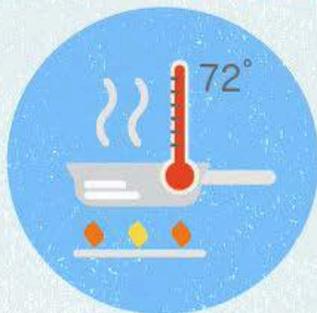


# 李斯特菌症(Listeriosis)

- ✓ 「李斯特菌症」列為「傳染病防治法」規定之第四類傳染病(衛福部106.12.29部授疾字第1060101687號公告修正，107.1.1生效)
- ✓ 臨床症狀：
  - 非侵襲性感染：發燒、腹瀉、噁心、嘔吐等腸胃炎症狀
  - 侵襲性感染：可導致敗血症及中樞神經系統感染(腦膜炎、腦膜腦炎最為常見)，伴隨死亡風險，主要發生在高風險族群(孕婦、胎兒、新生兒、年長者及免疫力低下者)
- ✓ 感染途徑：
  - 1.主要透過食用受污染食物或水
  - 2.垂直感染：孕婦感染後，經胎盤傳染胎兒，新生兒亦可能生產過程，接觸母親產道受到感染
  - 3.人畜共通傳染病：直接接觸李斯特菌而感染，如獸醫或畜產工作者經常接觸帶菌動物或家畜排泄物而感染
- ✓ 潛伏期：長短不一(3~70天，通常為21天)
- ✓ 流行概況：WHO 2015年研究，推估2010年全球感染病例數約23,150人，平均發生率為每10萬人0.337例，發生率相較於其他食媒病原為低，死亡率則為每10萬人0.08例，致死率可達25.9%。另，台灣確認案例數：107年168件、108年164件、109年104件(統計至09.23止)，發生地區：主要發生於六都，其次為新竹、苗栗及屏東
- ✓ 治療方法：抗生素治療，以Ampicillin及Penicillin為優先考慮的藥物

# 李斯特菌症預防方法

## 72°C以上熟食才安全



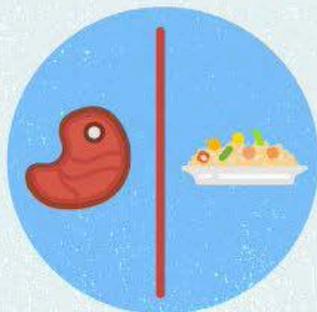
- 食物澈底煮熟

## 注意食物保鮮時限



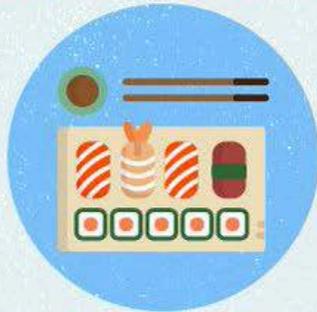
- 避免放在室溫 > 4小時
- 避免冷藏超過保存期限

## 生熟食分開避免交叉感染



- 處理生熟食使用不同器具
- 澈底洗淨雙手器具

## 高風險族群注意飲食



- 避免食用可能受汙染食品，或需充分加熱再食用

---

# 單核球增多性李斯特菌 之食品衛生標準

# 「食品中微生物衛生標準」草案第2次預告

## 109.04.23衛授食字第1091300314號

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國109年4月23日  
發文字號：衛授食字第1091300314號  
附件：「食品中微生物衛生標準」草案總說明及逐條說明之pdf檔各1份



衛生福利部 公告

發文日期：中華民國109年4月23日  
發文字號：衛授食字第1091300396號  
附件：「乳品類衛生標準」、「罐頭食品類微生物衛生標準」、「冰類微生物衛生標準」、「嬰兒食品類微生物衛生標準」、「冷凍食品類微生物衛生標準」、「包裝飲用水及盛裝飲用水微生物衛生標準」、「飲料類微生物衛生標準」、「生食用食品類衛生標準」、「生熟食混合即食食品類衛生標準」及「液蛋衛生標準」等10項標準之原條文及廢止理由pdf檔各1份



日期	109.4.23	單位	食品組	編號	
標題	第二次預告訂定「食品中微生物衛生標準」草案				

衛生福利部(下稱衛福部)為整合有關食品微生物之相關標準，前經參考國際管理趨勢、風險評估及國內需求，於107年6月11日曾預告「食品中微生物衛生標準」草案，該草案自預告後蒐集各界評論意見，並酌予調整內容後，於本(23)日辦理第二次預告，評論期為60日，以蒐集各界意見。

本次預告與前次預告內容主要修正之處：新增「**生鮮即食食品及生熟食混和即食食品類**」有關**單核球增多性李斯特菌**之限量規定；調整**採樣計畫**適用之食品類別；衛福部108年11月7日公布之「**液蛋衛生標準**」內容，整併於本次標準草案。此外，考量本標準之更新，相關檢驗技術及量能之因應尚需時間配合調整，故本標準將提供緩衝期至民國**110年7月1日起實施**。

# 「食品中微生物衛生標準」草案之管制項目

109.4.23第2次預告

食品品項	總生菌數	腸桿菌科	大腸桿菌群	大腸桿菌	大腸桿菌 O157:H7	金黃色葡萄球菌	金黃色葡萄球菌腸毒素	沙門氏菌	單核球增多性李斯特菌	腸炎弧菌	阪崎腸桿菌(屬)	糞便性鏈球菌	綠膿桿菌
1. 乳及乳製品類		CFU (1.1~1.4)		MPN (1.5)			定性 (1.1~1.5)	定性 (1.1~1.5)	定性 (1.1~1.5)				
2. 嬰兒食品類		CFU (2.1~2.3)	MPN (2.4)					定性 (2.1~2.4)	定性 (2.1~2.4)		MPN (2.1~2.3)		
3. 生鮮即食食品及生熟食混和即食食品類				MPN (3.3, 3.4)	定性 (3.3, 3.4)			定性 (3.1~3.5)	定性 (3.1~3.4)	MPN (3.1, 3.2)			
4. 包裝/盛裝飲用水及飲料類		CFU (4.2~4.4, 4.6, 4.7)	CFU (4.1)	MPN (4.5)	定性 (4.5)			定性 (4.5, 4.7)				CFU (4.1)	CFU (4.1)
5. 冷凍食品及冰類		CFU (5.1~5.3)		MPN (5.4)				定性 (5.1~5.3, 5.5, 5.6)		MPN (5.5, 5.6)			
6. 其他即食食品類						CFU (6.1~6.3)		定性 (6.1~6.3)	CFU (6.1~6.3)				
7. 液蛋類	CFU (7.2)							定性 (7.1)					

◎罐頭食品：經保溫試驗(37°C，10天)檢查合格，沒有因微生物繁殖而導致產品膨罐、變形或pH值改變等情形。

# 單核球增多性李斯特菌限量標準(草案)

食品類別	食品品項	限量標準	分離培養方法
1. 乳及乳製品類	1.1 鮮乳、調味乳及乳飲品 1.2 乳粉、調製乳粉及供為食品加工原料之乳清粉 1.3 發酵乳 1.4 本表第1.6項所列罐頭食品以外之煉乳	陰性	增菌培養 (定性法)
	1.5 乾酪(Cheese)、奶油(Butter)及乳脂(Cream)		
2. 嬰兒食品類	2.1 嬰兒配方食品 2.2 較大嬰兒配方輔助食品 2.3 特殊醫療用途嬰兒配方食品		
	2.4 本表第2.5項所列罐頭食品以外之其他專供嬰兒食用之副食品		
3. 生鮮即食食品及生熟食混和即食食品類	3.1 生鮮即食水產品 3.2 混和生鮮即食水產品之生熟食混和即食食品		
	3.3 生鮮即食蔬果 3.4 混和生鮮即食蔬果之生熟食混和即食食品		
6. 其他即食食品類	6.1 本標準表1-表5所列以外之其他經復水或沖調即可食用之食品 6.2 本標準表1-表5所列以外之其他即食食品，以常溫或熱藏保存者 6.3 本標準表1-表5所列以外之其他即食食品，以冷藏或低溫保存者，包括： -經復熱後即可食用之冷藏或低溫即食食品(如：18°C鮮食) -冷藏甜點、醬料等	100 CFU/g(mL)	CFU平板 計數法

◎採樣計畫：限乳及乳製品類、嬰兒食品類

# 肉、乳、蛋動物源食品擬輸銷歐盟案

## Regulation (EC) No 2073/2005 : 食品微生物標準

### ANNEX I : Microbiological criteria for foodstuffs

Chapter 1.	Food safety criteria .....	9
Chapter 2.	Process hygiene criteria .....	15
2.1.	Meat and products thereof .....	15
2.2.	Milk and dairy products .....	18
2.3.	Egg products .....	21
2.4.	Fishery products .....	22
2.5.	Vegetables, fruits and products thereof .....	23
Chapter 3.	Rules for sampling and preparation of test samples .....	24
3.1.	General rules for sampling and preparation of test samples .....	24
3.2.	Bacteriological sampling in slaughterhouses and at premises producing minced meat and meat preparations .....	24

# Regulation (EC) No 2073/2005 : 食品微生物標準

## 單核球增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)檢驗方法

TFDA檢驗方法	EC 2073/2005 ANNEX I Food category	EU Limit		Stage where the criterion applies
		m	M	
1. (MOHWM0021.01)食品 微生物之檢驗方法 – 乳品中 單核球增多性李斯特菌之檢 驗(Methods of Test for Food Microorganisms – Test of <i>Listeria monocytogenes</i> in Dairy Foods) 2. (MOHWM0026.02)食品 微生物之檢驗方法-單核球增 多性李斯特菌之檢驗 (Methods of Test for Food Microorganisms – Test of <i>Listeria monocytogenes</i> )	1.1 Ready-to-eat foods intended for infants and ready-to-eat foods for special medical purposes	Not detected In 25 g		Products placed on the market during their shelf-life
	1.2 Ready-to-eat foods able to support the growth of <i>L. monocytogenes</i> , other than those intended for infants and for special medical purposes	Not detected In 25 g		Before the food has left the immediate control of the food business operator, who has produced It (離廠前)
		100 cfu/g		Products placed on the market during their shelf-life (販賣場所)
1.3 Ready-to-eat foods unable to support the growth of <i>L. monocytogenes</i> , other than those intended for infants and for special medical purposes <sup>(a)</sup>	100 cfu/g		Products placed on the market during their shelf-life	

<sup>(a)</sup> Products with  $\text{pH} \leq 4.4$  or  $\text{aw} \leq 0.92$ , products with  $\text{pH} \leq 5.0$  and  $\text{aw} \leq 0.94$ , products with a shelf-life of less than **five days** are automatically considered to belong to this category. Other categories of products can also belong to this category, subject to scientific justification.

---

# 單核球增多性李斯特菌 之檢驗方法

# 食品微生物之檢驗方法 - 單核球增多性李斯特菌之檢驗

109.06.23公告修正

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國109年6月23日  
發文字號：衛授食字第1091900915號  
附件：檢驗方法1份



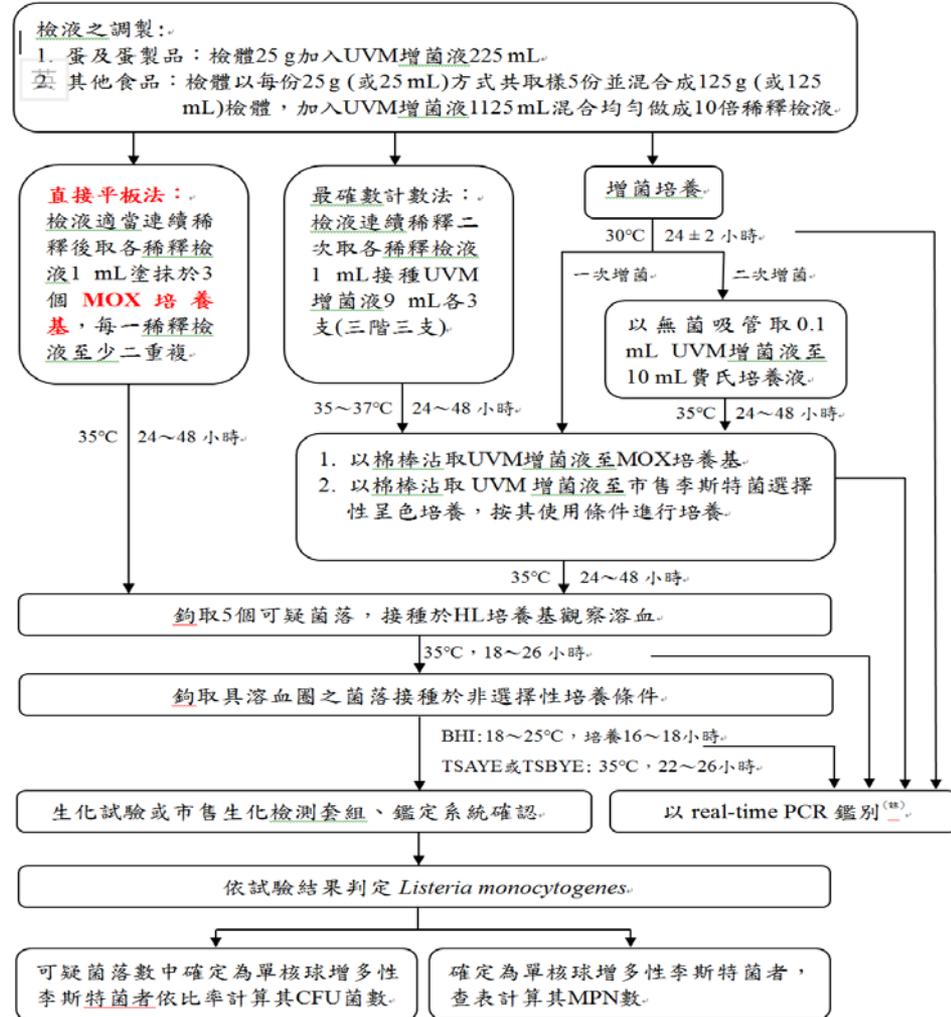
主旨：修正「食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌之檢驗」，並自中華民國一百零九年八月一日生效。

依據：食品安全衛生管理法第三十八條

公告事項：修正「食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌之檢驗」

部長陳時中

檢驗流程圖



# 乳品中單核球增多性李斯特菌之檢驗

## 109.08.25檢驗方法審查小組會議審查

88年11月22日衛署食字第88072701號公告

102年12月17日部授食字第1021951157號公告修正

食品微生物之檢驗方法—乳品中單核球增多性李斯特菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms – Test of

*Listeria monocytogenes* in Dairy Foods

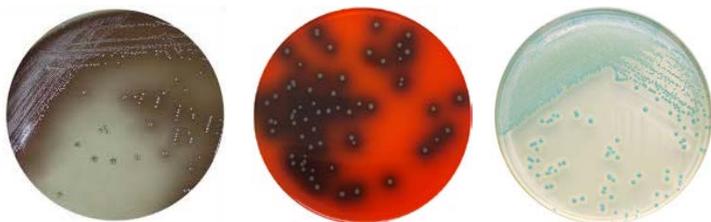
第一部：乳品中單核球增多性李斯特菌之分離與鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於乳品中單核球增多性李斯特菌(簡稱李斯特菌)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經前處理、增菌後，續以選擇性培養基培養進行檢測。

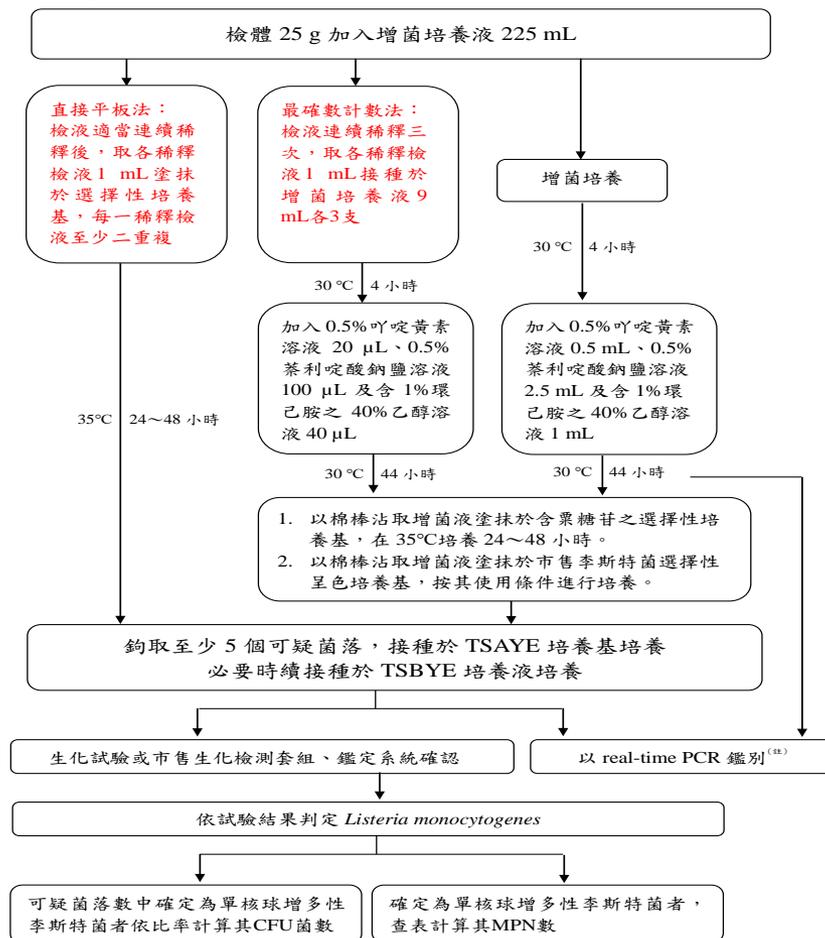
### 1. 增菌培養法(定性檢驗)

### 2. 直接平板法(CFU)

### 3. 最確數計數法(MPN)



#### 檢驗流程圖



# 單核球增多性李斯特菌之檢驗方法

## 微生物檢驗之主要儀器設備



高壓滅  
菌釜



培養箱  
水浴槽



生物安全  
操作櫃



生化試  
驗鑑定

# 增菌培養液及選擇性培養基

## 食品中單核 球增多性李 斯特菌

- ✓ UVM培養液(UVM broth)
- ✓ 費氏培養液(Fraser broth)
- ✓ 改良式牛津培養基(Modified Oxford medium, MOX)
- ✓ 李斯特菌選擇性呈色培養基(chromogenic differential selective agars)
- ✓ 馬血(或綿羊血)雙重培養基(Horse or sheep blood overlay medium, HL)

- 增菌培養液(Buffered listeria enrichment broth, BLEB)
- 含粟糖苷之選擇性培養基
  - 牛津培養基(Oxford medium, OXA)
  - 改良式牛津培養基(Modified Oxford medium, MOX)
  - 帕爾康李斯特菌選擇性培養基  
(PALCAM Listeria selective agar, PALCAM)
- 李斯特菌選擇性呈色培養基(chromogenic differential selective agars)

## 乳品中單核 球增多性李 斯特菌

# UVM培養液(UVM broth)

組成分	克數	功能
胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g	微生物生長之營養源
胰化蛋白胨(tryptone)	5.0 g	微生物生長之營養源
雷藍可粉末(Lab Lemco powder)	5.0 g	微生物生長之營養源
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g	微生物生長之營養源
氯化鈉	20.0 g	維持滲透壓，另可以抑制腸球菌(enterococci)的生長
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	12.0 g	pH緩衝劑
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.35 g	pH緩衝劑
粟糖苷(esculin)	1.0 g	李斯特菌屬 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解粟糖苷，產生葡萄糖
2%萘利啶酸溶液 (2% nalidixic acid solution)	1.0 mL	抑制革蘭氏陰性菌的生長
吡啶黃素(acriflavin-HCl)	12.0 mg	抑制許多其他革蘭氏陽性菌的生長
蒸餾水	1000 mL	

- 2%萘利啶酸溶液：取萘利啶酸鈉鹽2.0 g，溶於蒸餾水100 mL，過濾除菌，冷藏備用。
- 加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，滅菌完成後應立即移出高壓滅菌釜冷卻，培養基因過熱而導致顏色變黑或變深，應予捨棄。

# 增菌培養液(Buffered listeria enrichment broth, BLEB)

組成分	克數	功能
胰化酪蛋白朊 (trypticase peptone)	17 g	微生物生長之營養源
植物蛋白朊(phytone peptone)	3 g	微生物生長之營養源
酵母抽出物(yeast extract)	6 g	微生物生長之營養源
葡萄糖(glucose)	2.5 g	微生物生長之碳源
氯化鈉	5 g	維持滲透壓
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	9.6 g	pH緩衝劑
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2.5 g	pH緩衝劑
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.35 g	pH緩衝劑
蒸餾水	1000 mL	

- 10%丙酮酸鈉鹽溶液(10% Sodium pyruvate solution)：取丙酮酸鈉鹽10 g，溶於蒸餾水100 mL，過濾除菌，冷藏備用。
- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，使用前再加入經過過濾除菌之10%丙酮酸鈉鹽溶液11.1 mL，混合均勻，最終pH值為7.3 ± 0.1。
- 增菌培養：250 mL檢液(檢體+BLEB增菌培養液)於30°C培養4h，加入0.5%吡啶黃素溶液0.5 mL、0.5%萘利啶酸鈉鹽溶液2 mL，及含1%環己胺(cycloheximide)之40%乙醇溶液1.25 mL，再培養44h。

# 費氏培養液(Fraser broth)

組成分	克數	功能
胨蛋白朊(proteose peptone)	5.0 g	微生物生長之營養源
雷藍可粉末(Lab Lemco powder)	5.0 g	微生物生長之營養源
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g	微生物生長之營養源
氯化鈉	20.0 g	維持滲透壓，另可以抑制腸球菌(enterococci)的生長
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.35 g	pH緩衝劑
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	12.0 g	pH緩衝劑
粟糖苷(esculin)	1.0 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與鐵離子反應形成黑色的複合物
2%萘利啶酸溶液 (2% nalidixic acid solution)	1.0 mL	抑制革蘭氏陰性菌的生長
氯化鋰(lithium chloride)	3.0 g	抑制其他細菌(如腸球菌)的生長
蒸餾水	1000 mL	

- 2%萘利啶酸溶液、0.25%吡啶黃素溶液及5%檸檬酸鐵銨溶液均以無菌濾膜(孔徑0.22 μm)過濾除菌。
- 加熱溶解後，量取10 mL，分裝於試管，以121°C滅菌15分鐘，滅菌完成後應立即移出高壓滅菌釜冷卻，冷藏備用。使用前於每支試管內加入已過濾除菌之0.25%吡啶黃素溶液0.1 mL及5%檸檬酸鐵銨溶液0.1 mL。

# 牛津培養基(Oxford medium, OXA)

組成分	克數	功能
哥倫比亞血液基礎培養基 (Columbia blood agar base) 成分：酪蛋白酵素水解物、蛋白 胨、酵母抽出物、牛心浸出物、 玉米澱粉及氯化鈉	39 ~ 44 g (視廠牌而定)	提供微生物生長所需營養，如氮 源、碳源、胺基酸及維生素等
粟糖苷(esculin)	1.0 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與 鐵離子反應形成黑色的複合物
檸檬酸鐵銨 (ferric ammonium citrate)	0.5 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與 鐵離子反應形成黑色的複合物
氯化鋰(lithium chloride)	15.0 g	抑制其他細菌(如腸球菌)的生長
洋菜(agar)	2.0 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，冷卻至50°C，加入經過濾除菌之含環己胺0.4 g、大腸菌素硫酸鹽0.02 g、吡啶黃素0.005 g、頭孢泰坦0.002 g及弗斯弗黴素0.01 g之無水乙醇/水(1:1)混合溶液10 mL，充分混勻。

# 改良式牛津培養基(Modified Oxford medium, MOX)

組成分	克數	功能
哥倫比亞血液基礎培養基 (Columbia blood agar base)	39 ~ 44 g (視廠牌而定)	提供微生物生長所需營養，如氮源、碳源、胺基酸及維生素等
粟糖苷 (esculin)	1.0 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與鐵離子反應形成黑色的複合物
檸檬酸鐵銨 (ferric ammonium citrate)	0.5 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與鐵離子反應形成黑色的複合物
氯化鋰 (lithium chloride)	15.0 g	抑制其他細菌(如腸球菌)的生長
1%腸黏菌素溶液 (1% colistin solution)	1.0 mL	抗生素，抑制其他細菌的生長
洋菜(agar)	2.0 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

- 加熱溶解後，以121°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.1，並用恆溫水浴方式，迅速冷卻至46°C，同時加入已過濾除菌之拉他頭孢(sodium moxalactam)溶液2 mL，混合均勻，每個培養皿分裝12 mL。(本培養基勿需再添加任何補充劑)。

# 帕爾康李斯特菌選擇性培養基 (PALCAM *Listeria* selective agar, PALCAM)

組成分	克數	功能
蛋白朊(peptone)	11.5 g	微生物生長之營養源
澱粉(starch)	0.5 g	碳源及能量來源
氯化鈉	2.5 g	維持滲透壓
甘露糖醇(mannitol)	5 g	發酵產酸與否，以區分非李斯特菌(如葡萄球菌、腸球菌)
酚紅(phenol red)	0.04 g	pH指示劑(紅色→黃色)
粟糖苷(esculin)	0.4 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與鐵離子反應形成黑色的複合物
檸檬酸鐵銨 (ferric ammonium citrate)	0.25 g	粟糖苷水解物質(6,7-二羥香豆素)與鐵離子反應形成黑色的複合物
葡萄糖(glucose)	0.25 g	碳源及能量來源
氯化鋰(lithium chloride)	7.5 g	抑制其他細菌(如腸球菌)的生長
洋菜(agar)	6.5 g	凝固劑
蒸餾水	500 mL	

- 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，冷卻至50°C，加入經過濾除菌之含多黏桿菌素B硫酸鹽0.005 g、吡啶黃素0.0025 g及西他利汀0.01 g之水溶液1 mL，充分混勻，最終pH值為7.2 ± 0.1。

# 馬血(或綿羊血)雙重培養基 (Horse or sheep blood overlay medium, HL)

組成分	克數	功能
哥倫比亞血液基礎培養基 (Columbia blood agar base)	39 ~ 44 g (視廠牌而定)	提供微生物生長所需營養，如氮源、碳源、胺基酸及維生素等
蒸餾水	1000 mL	

- 底層：加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，置於46°C水浴中備用。
- 上層：將4%去血纖維蛋白馬血(或綿羊血)加入46°C溶解態之哥倫比亞血液基礎培養基中，充分混勻。
- 取溶解態之底層培養基10 mL，加入培養皿，凝固後再倒入上層培養基5 ~ 6 mL，冷藏備用，培養基顏色改變，應予捨棄。

## Difco™ Columbia Blood Agar Base

Approximate Formula\* Per Liter

Pancreatic Digest of Casein .....	10.0	g
Proteose Peptone No. 3.....	5.0	g
Yeast Extract .....	5.0	g
Beef Heart, Infusion from 500 g .....	3.0	g
Corn Starch.....	1.0	g
Sodium Chloride .....	5.0	g
Agar .....	15.0	g

## BBL™ Columbia Agar Base

Approximate Formula\* Per Liter

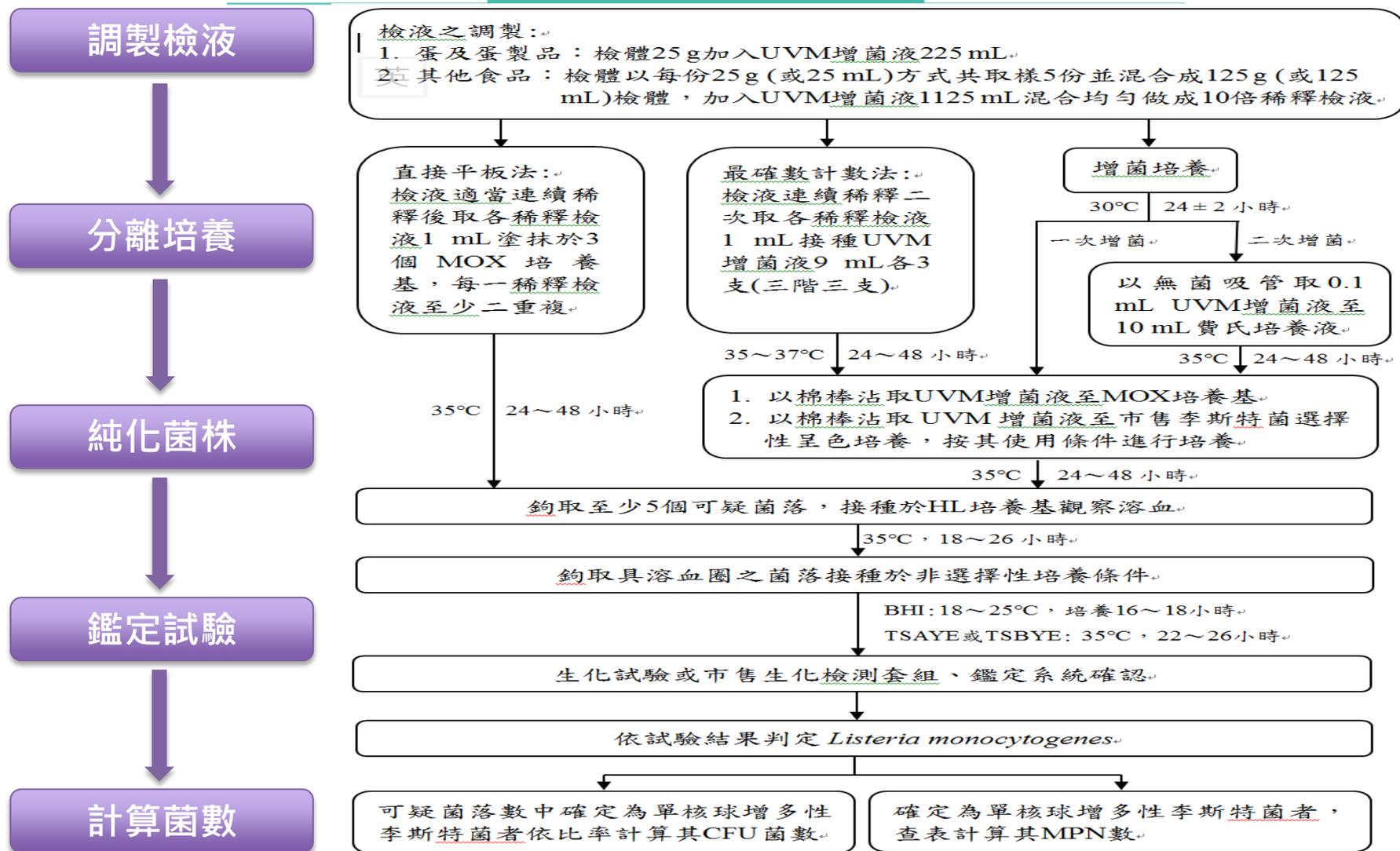
Pancreatic Digest of Casein .....	10.0	g
Meat Peptic Digest.....	5.0	g
Yeast Extract .....	5.0	g
Heart Pancreatic Digest .....	3.0	g
Corn Starch.....	1.0	g
Sodium Chloride .....	5.0	g
Agar .....	13.5	g

**MERCK**

## Typical Composition (g/litre)

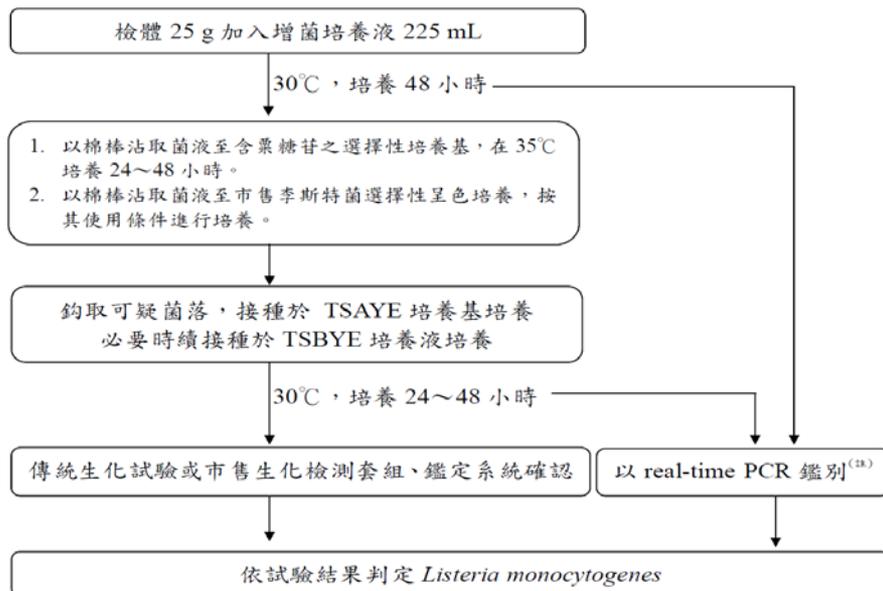
Special nutrient substrate 23.0; starch 1.0; sodium chloride 5.0; agar-agar 13.0.

# 食品中單核球增多性李斯特菌檢驗流程圖



# 乳品中單核球增多性李斯特菌檢驗流程圖

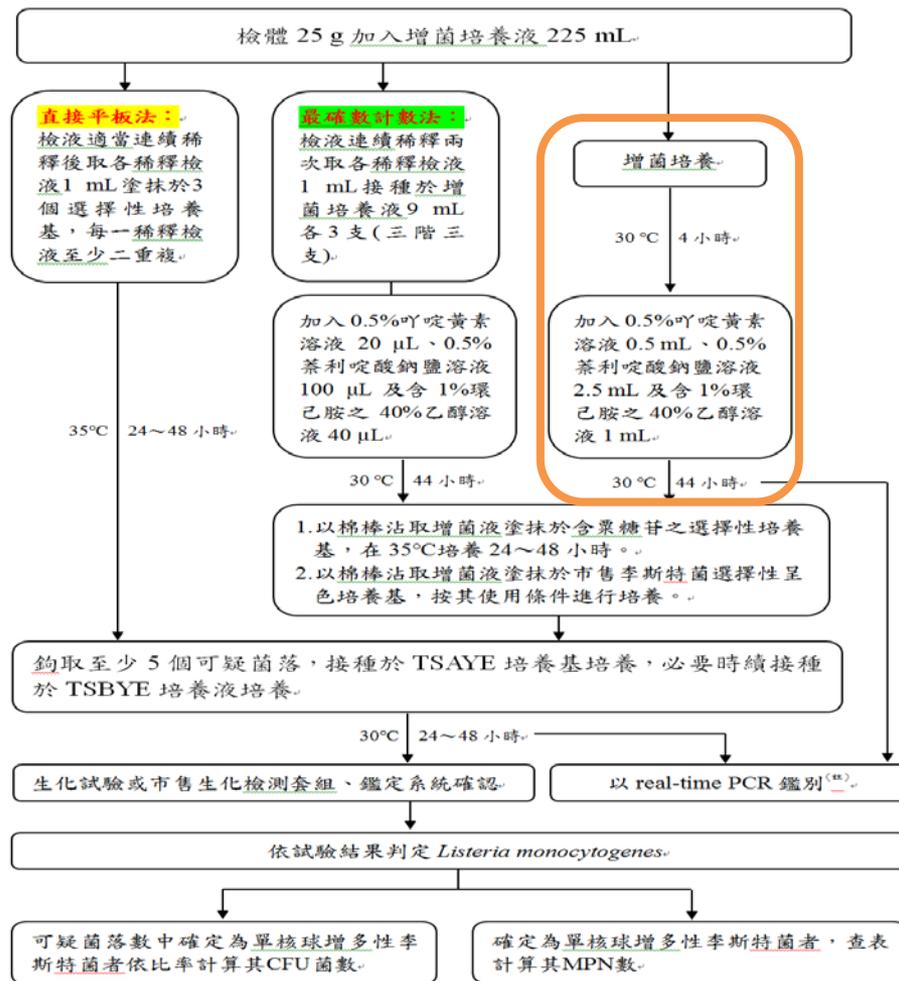
## 現行公告



1. 增菌培養法(定性檢驗)
2. 直接平板法(CFU)
3. 最確數計數法(MPN)

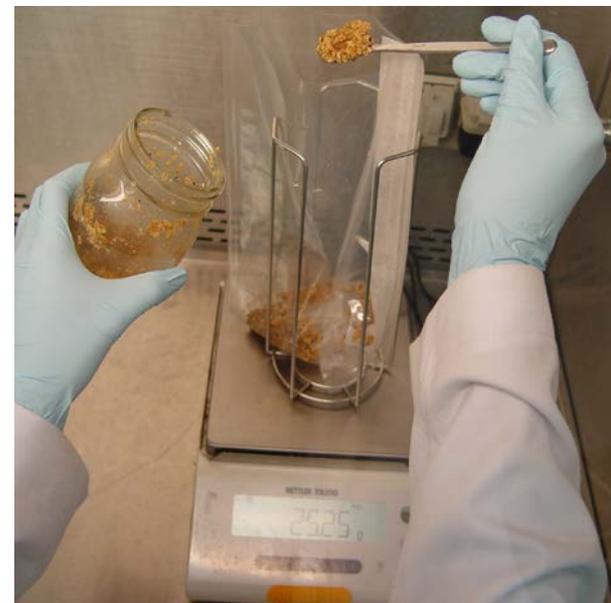


## 修訂草案



# 調製檢液

## 檢體混合均勻



採樣檢體置於無菌  
均質瓶

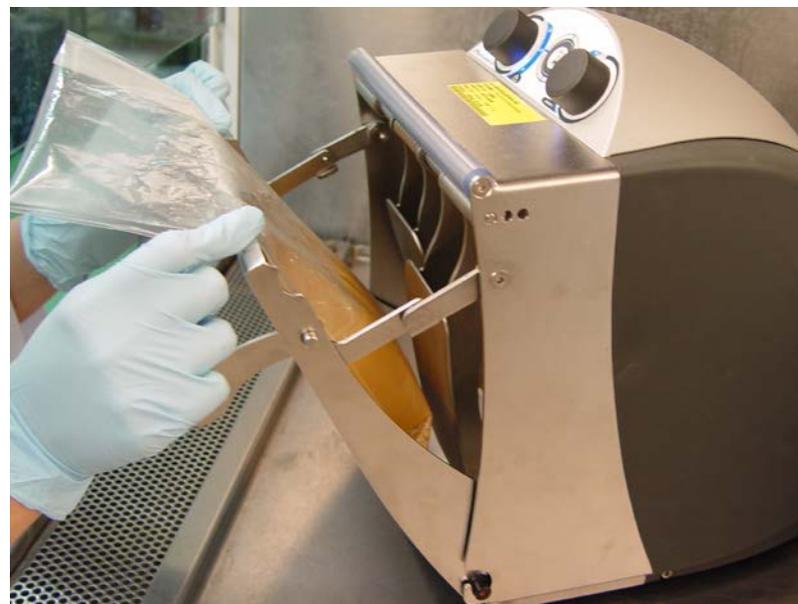


攪拌均質機  
混合檢體



稱取檢體125g  
(蛋及蛋製品、乳品25g)

# 製備稀釋檢液( I ) : 10倍稀釋檢液

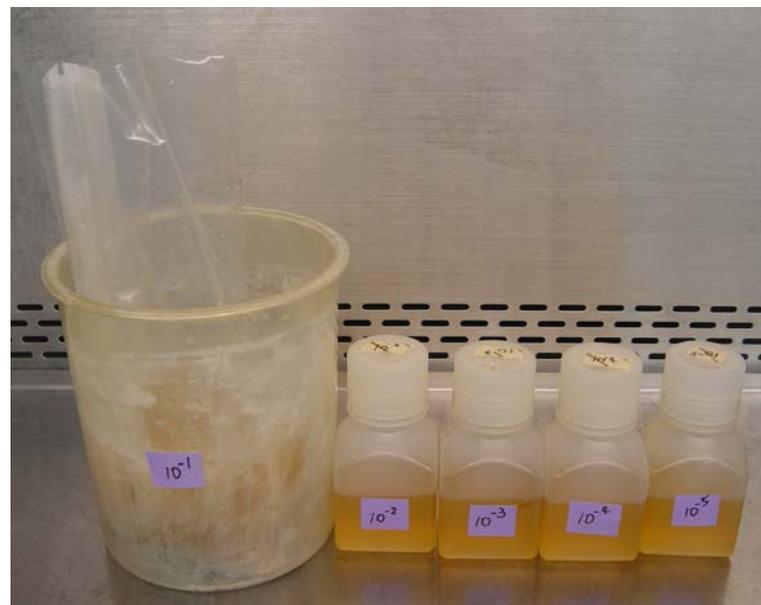


加入9 X 培養液  
(食品 : UVM/乳品 : BLEB)

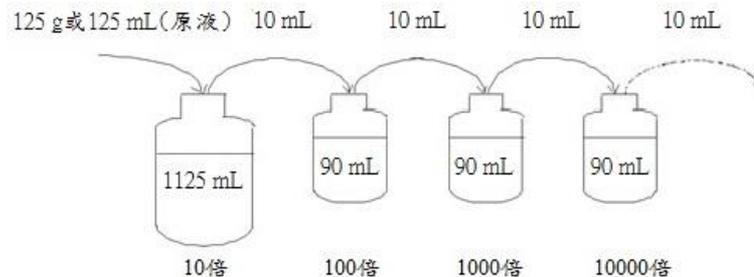


鐵胃(或攪拌均質機)混合均勻，  
作成10倍稀釋檢液

# 製備稀釋檢液(II)：系列稀釋檢液



製備100, 1000, 10000等系  
列稀釋檢液(10 mL + 90 mL)



# 鑑別試驗

分離培養

增菌培養法  
(定性)

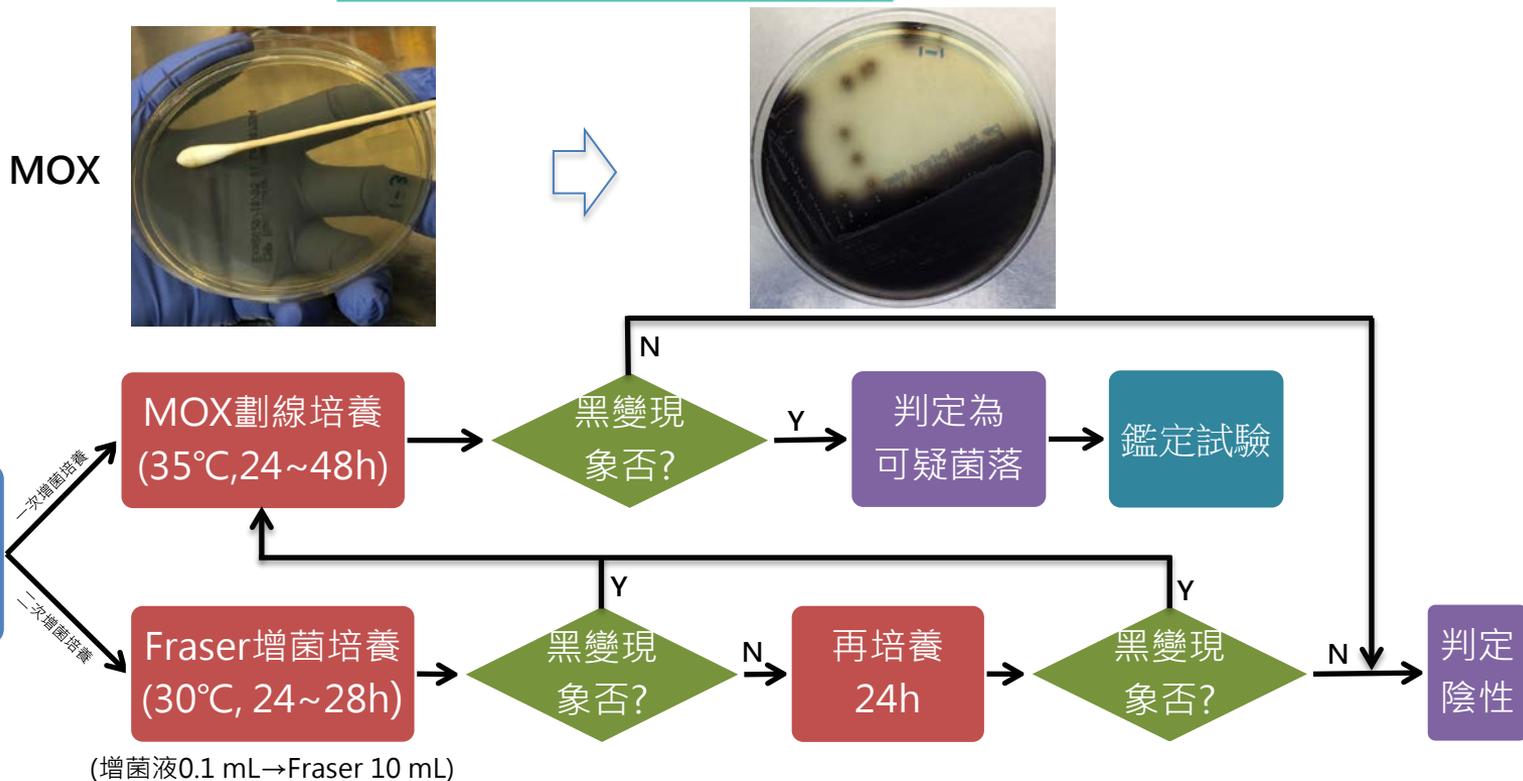
最確數計數法  
MPN/g(mL)

直接平板法  
CFU/g(mL)

一次增菌培養  
(UVM)

二次增菌培養  
(UVM→Fraser broth)

# 分離培養(I)-增菌培養法(定性)



# 分離培養(II)-最確數計數法(MPN)



各檢液吸取1 mL  
· 接種於UVM培  
養液9 mL，各3支  
(3階3支)

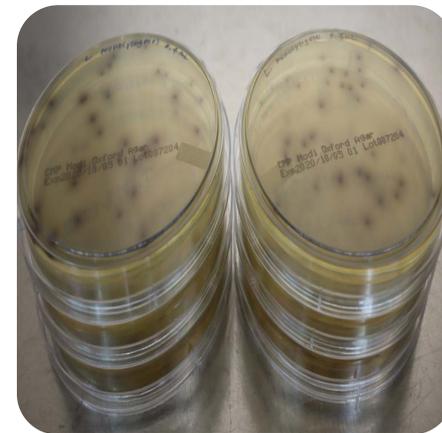


增菌培養：  
UVM培養液於  
35 ~ 37°C 培養24  
~ 48小時



分離培養：  
增菌培養液劃線  
(二區劃線) 於  
MOX培養基，於  
35°C 倒置培養  
24~48小時

# 分離培養(III)-直接平板法(CFU)

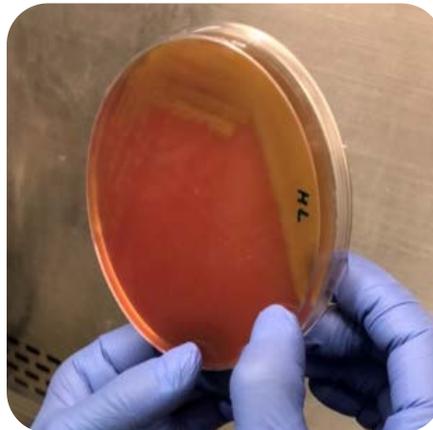
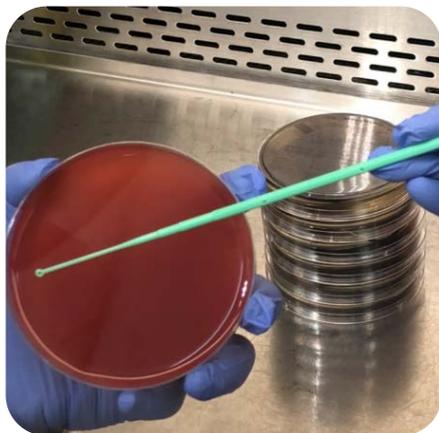


檢液充分搖勻→吸取  
1 mL，分注於3個  
MOX培養基(如0.3,  
0.3及0.4 mL)  
◎每檢液至少做2重  
複，共6個平板

表面塗抹法：  
以無菌塗抹曲棒將檢  
液均勻塗抹至乾，於  
35°C 倒置培養  
24~48小時

計數菌落數：  
選取25~250個可疑  
菌落之平板予以計數

# 溶血試驗( $\beta$ -hemolysis)



MOX培養基(增菌培養/MPN/CFU)挑取至少5個可疑菌落→接種於HL培養基→35°C倒置培養18~26小時

觀察溶血現象：培養皿底部正對光源，觀察透明之溶血現象( $\beta$ -hemolysis)

鉤取1~3個小且具溶血圈之菌落，以非選擇性培養基(如BHI、NA等)培養後，進行後續菌種鑑別試驗(運動性試驗、革蘭氏染色、生化試驗)

# 鑑定試驗

## ➤ 傳統鑑定方法

## ➤ API生化測試套組

## ➤ Vitek自動微生物鑑定系統

※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。

◎單核球增多性李斯特菌免疫檢測試紙條(RapidChek *Listeria monocytogenes* test)  
TFDA首頁>業務專區>研究檢驗>食品篩檢資訊專區>2.食品篩檢資訊專區推薦公開之產品資訊(<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=10817&key=%e6%9d%8e&scid=743>)

∴ 目前位置：首頁 > 業務專區 > 研究檢驗 > 食品篩檢資訊專區 > 2. 食品篩檢資訊專區公開之產品資訊

分類： 區域檢索：

序號	標題	發布日期
1	啟新生物科技有限公司/單核球增多性李斯特菌免疫檢測試紙條(冷凍裹粉熟雞肉, 熱狗, 醃(製)火腿, 冰淇淋, 冷凍熟蝦) 	2019-06-24



# 傳統鑑定方法

## □ 初步鑑別試驗

1. 運動性試驗
2. 鏡檢(革蘭氏染色)

## □ 生化試驗

1. 傘狀運動試驗(Umbrella motility test)
2. CAMP試驗(CAMP test)
3. 觸酶試驗(Catalase test)
4. 氧化酶試驗(Oxidase test)
5. 歐普氏試驗(VP test)
6. 甲基紅試驗(Methyl red test)
7. 醣類利用試驗(Carbohydrate utilization test) :  
鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、麥芽糖、粟糖苷
8. 硝酸鹽還原反應(Reduction of nitrate)

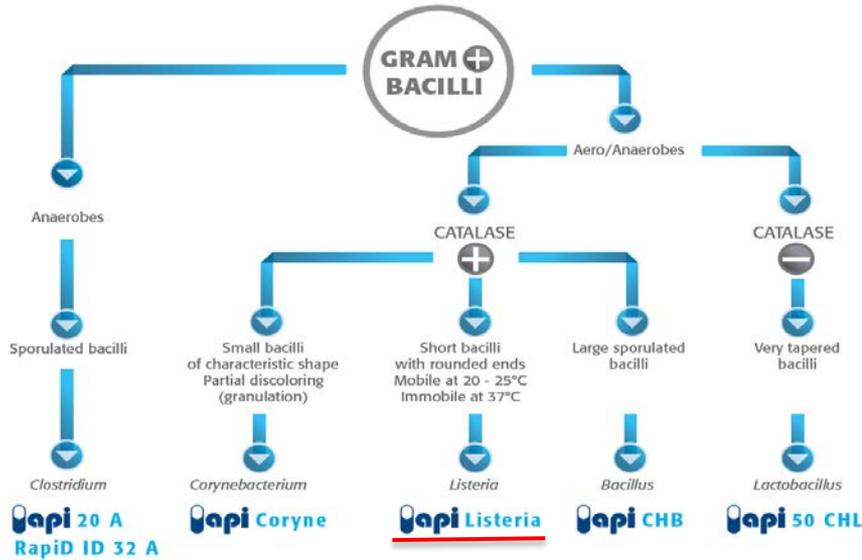
# 結果判定

試驗或基質		正反應 (+)	負反應 (-)	單核球增多性李 斯特菌之反應	
分離培養	MOX培養基	小菌落，周邊產生黑色沈澱	菌落周邊無黑色沈澱產生	+	
	李斯特菌選擇性呈色培養基	視市售品牌之呈色原理判讀典型菌落	無典型菌落	+	
β-溶血試驗		具微弱溶血透明現象	無左述現象	+	
初步鑑別試驗	運動性試驗	細菌翻滾運動	無左述現象	+	
	革蘭氏染色	陽性(深紫色)、無芽孢、短桿菌	無左述現象	+	
生化試驗	傘狀運動試驗	培養基上緣下3~5 mm出現傘狀	無左述現象	+	
	CAMP試驗	與 <i>S. aureus</i> 相接處具溶血現象，與 <i>R. equi</i> 相接處則否	無左述現象	+	
	觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+	
	氧化酶試驗	深藍色	非深藍色(原色)	-	
	歐普氏試驗	粉紅色	原色	+	
	甲基紅試驗	紅色	黃色	+	
	醣類利用試驗	鼠李糖	黃色	紫色	+
		木糖	黃色	紫色	-
		甘露糖	黃色	紫色	-
		葡萄糖	黃色	紫色	+
麥芽糖		黃色	紫色	+	
	粟糖苷	黃色	紫色	+	
硝酸鹽還原反應		紅紫色	原色	-	

# API生化測試套組

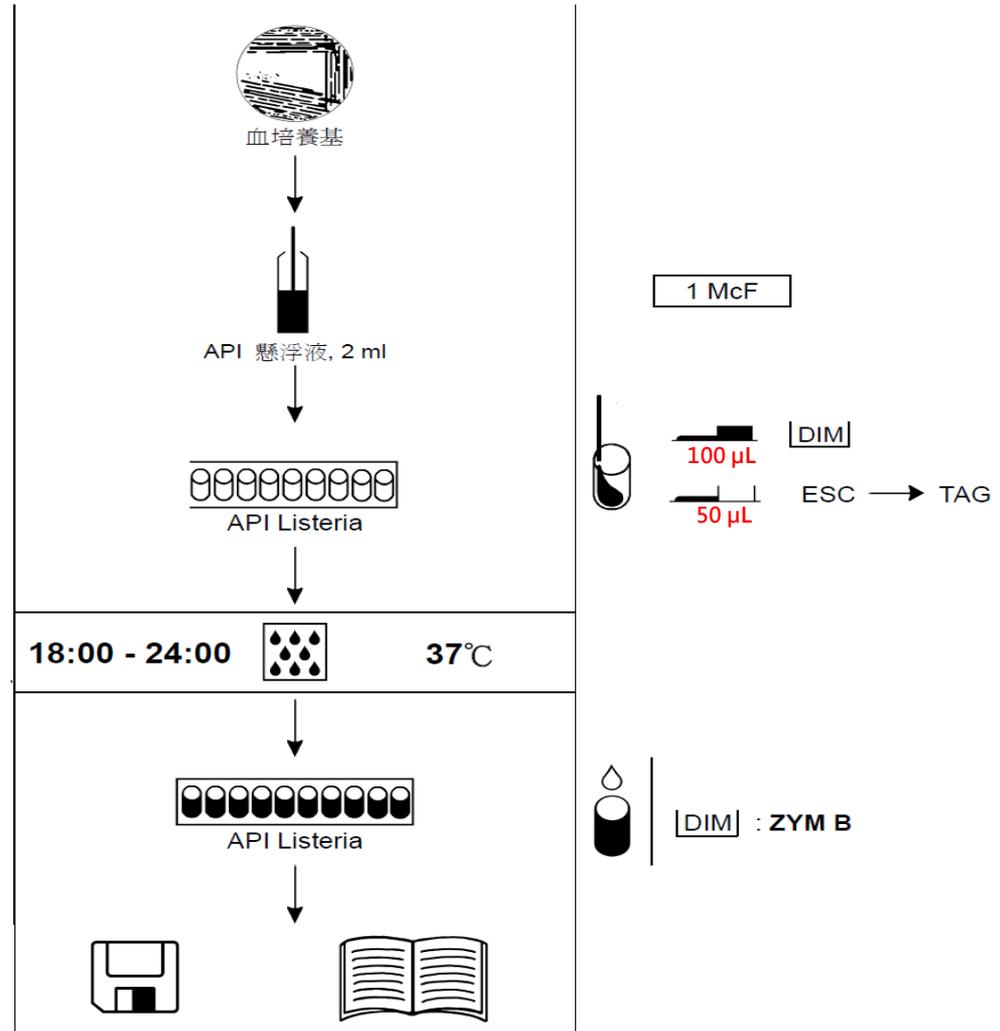
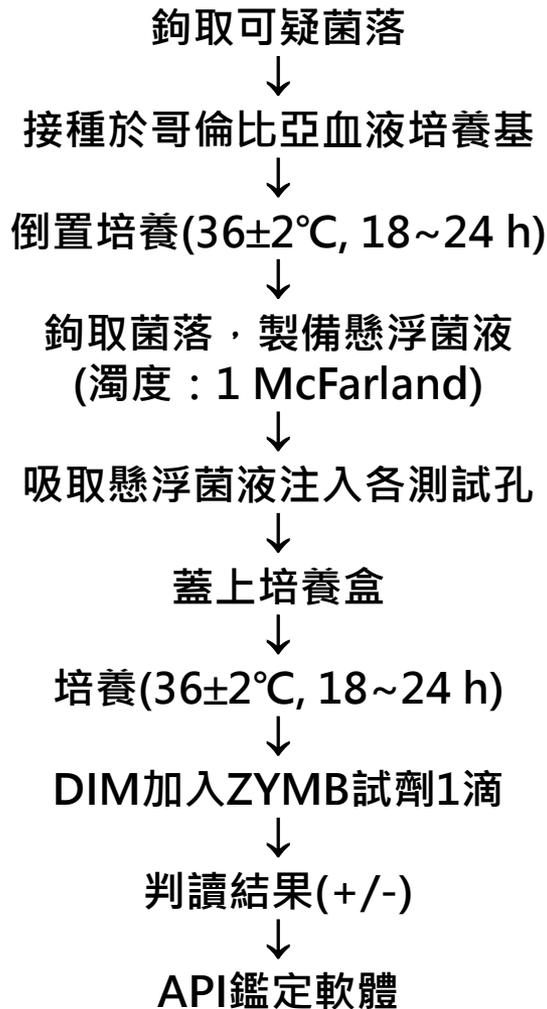
- Species present in database
- Species identifiable with additional tests
- Changed taxon
- New species

	API® 20 E	API® 10 S	Rapid 20 EM	API® 20 NE			API® Staph	API® 20 Strep	API® Candida	API® 20 C AUX	API® 20 A	API® Coryne	API® Campy	API® Listeria	API® NH	API® 50 CHE	API® 50 CHL	API® 50 CHB		ID 32 E	Rapid ID 32 E	ID 32 GN	ID 32 Staph	Rapid ID 32 Strep	ID 32 C	Rapid ID 32 A
<i>Listeria ivanovii</i>								●				●		●										●		
<i>Listeria monocytogenes/innocua</i>												●														
<i>Listeria monocytogenes</i>								●				●		●										●		
<i>Listeria seeligeri</i>								●				●		●										●		
<i>Listeria welshimeri</i>								●				●		●										●		
<i>Listeria spp</i>								●				●												●		



# API Listetia操作流程

## 操作流程



# API Listetia生化試驗結果判定

POS



NEG



測試結果



# API Listeria 測試結果判讀

api® Listeria

07887K - CN - 2004/11

讀表

測試	活性成分	QTY (mg/cup.)	反應	結果	
				陰性	陽性
[DIM]	酶底物	0,106	區別 <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	<u>ZYM B / &lt; 3 min</u>	
				淡橙色 粉米色 灰褐色	橙色
ESC	七葉靈 檸檬酸鐵	0,16 0,024	水解 (七葉靈)	淡黃色	黑色
αMAN	4-硝基-αD-吡喃甘露糖	0,045	-甘露糖苷酶	無色	黃色
DARL	D-阿拉伯糖	0,4	產酸 (D-阿拉伯糖)	紅色 / 橙紅色	黃色 / 橙黃色
XYL	D-木糖	0,4	產酸 (木糖)		
RHA	L-鼠李糖	0,4	產酸 (鼠李糖)		
MDG	α-甲基-D-葡萄糖苷	0,4	產酸 ( D-甲基葡萄糖苷)		
RIB	D-核糖	0,4	產酸 (核糖)		
G1P	1-磷酸葡萄糖	0,4	產酸 (1-磷酸葡萄糖)		
TAG	D-塔格糖	0,4	產酸 (塔格糖)		

- 可以按照使用原料的濃度調整使用量。
- 某幾個孔含有動物來源的產品, 特別是蛋白腴

# API Listetia鑑定結果判讀



Choose your language : English ▼

APIWEB™

Welcome to  
APIWEB™

If you are registered  
enter your login and password :

Login / E-mail

ywang

Password

.....



[I have forgotten my password](#)



Welcome to APIWEB™



API

ID32

- API 10S
- API 20 A
- API 20 C AUX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA**
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

- ID 32 C
- ID 32 E
- ID 32 STAPH
- rapid ID 32 A
- rapid ID 32 E
- rapid ID 32 STREP

軟體判定鑑別結果

<https://apiweb.biomerieux.com/login>

# API Listetia鑑定結果判讀

Taiwan Food and Drug Administration - Taipei

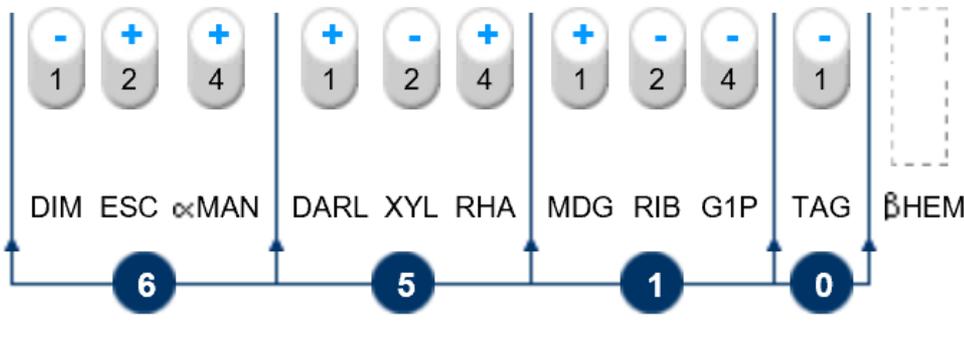
APIWEB™

Reset

API LISTERIA V2.0

[Instructions](#)

[Color check](#)



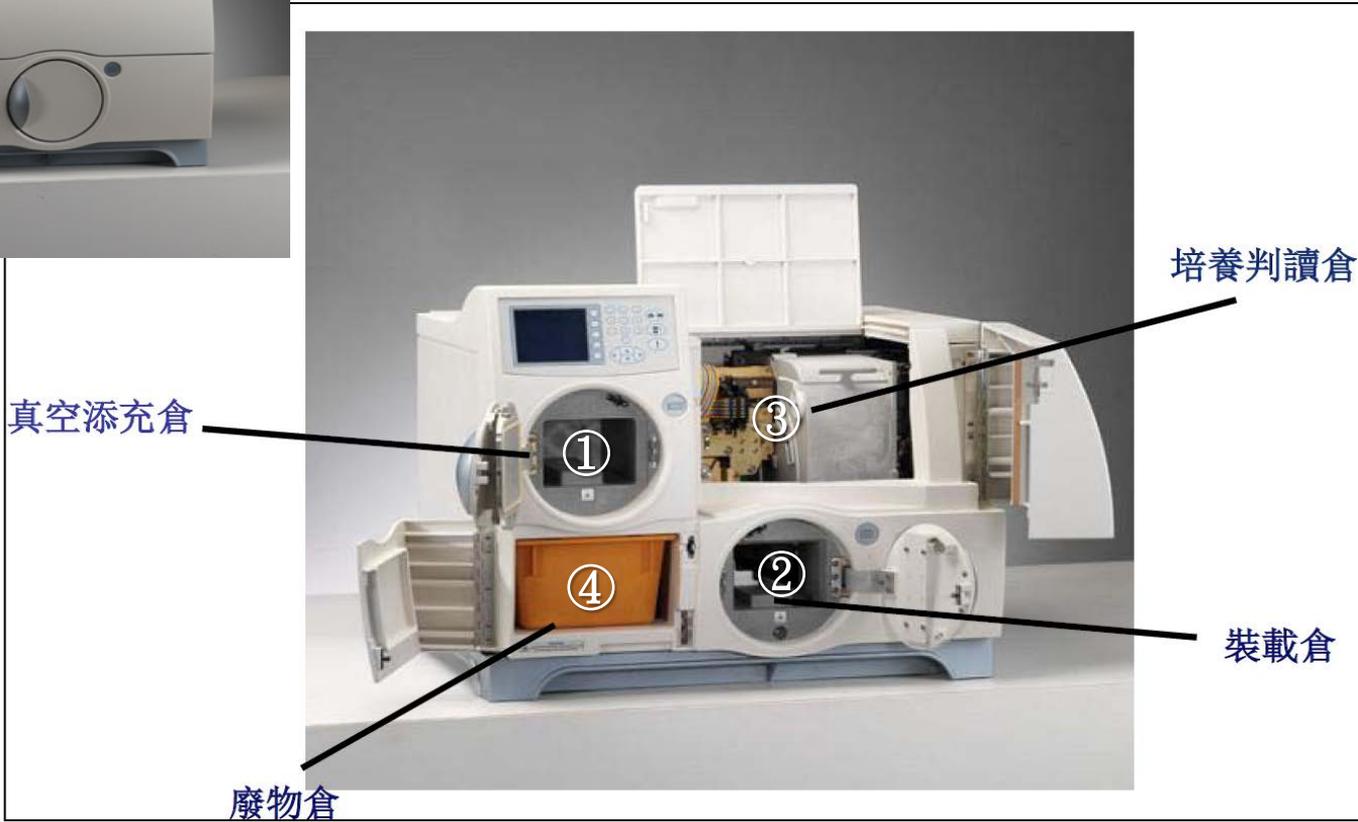
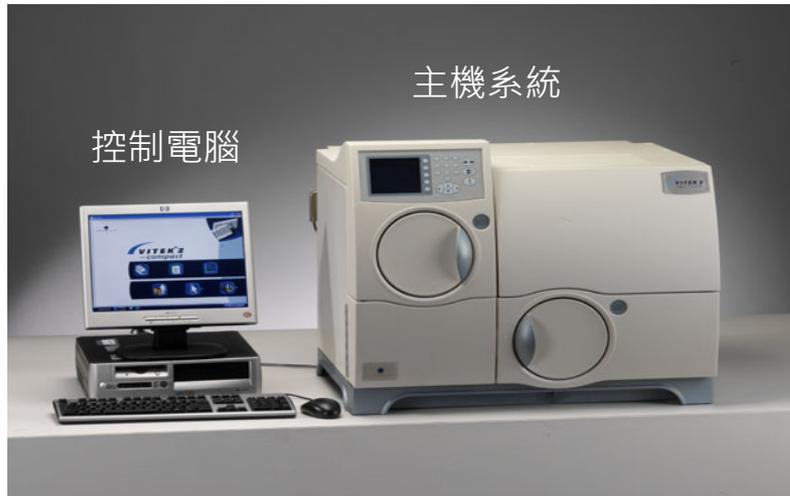
## GOOD IDENTIFICATION

Strip	API LISTERIA V2.0
Profile	6 5 1 0
Note	CRITICAL PATHOGEN

Significant taxa	% ID	T	Tests against
Listeria monocytogenes	98.5	1.0	

Next taxon	% ID	T	Tests against
Listeria innocua	1.3	0.58	DIM 99%

# Vitek自動微生物鑑定系統



# Vitek自動微生物鑑定系統



**VITEK® 2 GP ID card size**  
10 cm x 6 cm x 0.5 cm, 16 grams

## VITEK® 2 GP ID card

### Identification of Gram-positive bacteria

Rapid, accurate species-level identification of clinically important Gram-positive bacteria

- Identify up to 120 organisms
- Convenient & safe: closed, ready-to-use disposable system

#### Biochemical Details

2	AMY	+	4	PIPLC	+	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	-	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

# Vitek自動微生物鑑定系統

Well	Test	Well	Test
2	D-AMYGDALIN (AMY)	32	POLYMIXIN B RESISTANCE (POLYB)
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C (PIPLC)	37	D-GALACTOSE (dGAL)
<b>5</b>	<b>D-XYLOSE (dXYL)</b>	38	D-RIBOSE (dRIB)
8	ARGININE DIHYDROLASE 1 (ADH1)	39	L-LACTATE alkalization (ILATk)
9	BETA-GALACTOSIDASE (BGAL)	42	LACTOSE (LAC)
<b>11</b>	<b>ALPHA-GLUCOSIDASE (AGLU)</b>	44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE (NAG)
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE (APPA)	<b>45</b>	<b>D-MALTOSE (dMAL)</b>
14	CYCLODEXTRIN (CDEX)	46	BACITRACIN RESISTANCE (BACI)
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE (AspA)	47	NOVOBIOCIN RESISTANCE (NOVO)
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE (BGAR)	50	GROWTH IN 6.5% NaCl (NC6.5)
17	ALPHA-MANNOSIDASE (AMAN)	<b>52</b>	<b>D-MANNITOL (dMAN)</b>
19	PHOSPHATASE (PHOS)	53	D-MANNOSE (dMNE)
20	Leucine ARYLAMIDASE (LeuA)	54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE (MBdG)
23	L-Proline ARYLAMIDASE (ProA)	56	PULLULAN (PUL)
24	BETA GLUCURONIDASE (BGURr)	57	D-RAFFINOSE (dRAF)
25	ALPHA-GALACTOSIDASE (AGAL)	58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) (O129R)
26	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE (PyrA)	59	SALICIN (SAL)
27	BETA-GLUCURONIDASE (BGUR)	60	SACCHAROSE/SUCROSE (SAC)
28	Alanine ARYLAMIDASE (AlaA)	62	D-TREHALOSE (dTRE)
29	Tyrosine ARYLAMIDASE (TyrA)	63	ARGININE DIHYDROLASE 2 (ADH2s)
30	D-SORBITOL (dSOR)	64	OPTOCHIN RESISTANCE (OPTO)
31	UREASE (URE)		

✓43 biochemical tests measuring carbon source utilization, enzymatic activities and resistance



# Vitek自動微生物鑑定系統

## 活化菌株

- 分離純化菌株劃線培養於TSA (35°C, 18~24小時)

## 製備菌液

- 0.45%無菌食鹽水3 mL加入專用小管
- 無菌棉花棒沾取菌落，製備懸浮菌液
- 調整懸浮菌液濃度至0.50~0.63 McF(McFarland←比濁計測定)

## Vitek上機

- GP(革蘭氏陽性菌)鑑定卡片
- 充填卡片(真空充填倉)
- 裝載卡片(裝載倉→讀取條碼→封口→載入卡片→移除卡片)
- 鑑定結果(時間少於8小時)

# Vitek自動微生物鑑定系統

沾取菌落



調整菌液濃度



GP鑑定卡片



設定工作表



裝載卡片



充填卡片



# Vitek鑑定報告

bioMérieux Customer:  
System #:

## Laboratory Report

Printed Aug 7, 2020 14:10 CST  
Printed by: LabSuper

McFarland: (0.50 - 0.63)

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 2420810403	Expires: Feb 14, 2020 12:00 CST
	Completed: Sep 19, 2019 17:13 CST	Status: Final	Analysis Time: 6.83 hours
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	99% Probability	Listeria monocytogenes	Confidence: Excellent identification
	Bionumber: 342200224733621		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:		% Probability	Confidence Level
Analysis Messages: Critical Pathogen, check Camp test and beta-hemolysis		96~99%	Excellent
Contraindicating Typical Biopattern(s)		93~95%	Very Good
		89~92%	Good
		85~88%	Acceptable

Biochemical Details																	
2	AMY	+	4	PIPLC	+	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	-	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

# Notes Associated with Certain Taxa

Taxa	Note
<i>Listeria innocua</i>	Possibility of <i>Listeria monocytogenes</i> . Check for <b>beta hemolysis</b> . <i>Listeria innocua</i> strains are non-hemolytic.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Critical pathogen, check <b>CAMP</b> test and <b>beta hemolysis</b> . The species identified may have significance to patient or sample outcome and can be stopped for review.

**Thanks for Your Attention**



衛生福利部  
食品藥物管理署  
Food and Drug Administration