

食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品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、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文標題。
- 二、增列部分器具及材料、試藥及試劑。
- 三、新增並修正部分試劑之配製。
- 四、採檢量增至五倍以提升檢出率(蛋/蛋製品除外)。
- 五、於 UVM 增菌培養後採二支線進行選擇性培養。
- 六、增加使用市售選擇性呈色培養基之使用建議。
- 七、變更醣類利用試驗之培養基之選用之及修正其製備流程。
- 八、新增 CAMP 試驗注意事項。
- 九、新增菌種保存之步驟。
- 十、增列第二部：單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢測。
- 十一、增列檢驗流程圖。
- 十二、修正部分敘述文字以免誤解。

食品微生物之檢驗方法－單核球增多性李斯特菌 之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
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> 第一部：食品中單核球增多性李斯特菌之分離與鑑別 1.適用範圍：本方法適用於乳品除外之禽畜肉、蛋及蛋製品等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。 2.1.工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好，操作平臺光度為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.生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。 2.2.2.乾熱滅菌器。 2.2.3.高壓滅菌釜。 2.2.4.冰箱：能維持$5\pm 3^{\circ}\text{C}$者。 2.2.5.冷凍櫃：保持$-30\pm 3^{\circ}\text{C}$者。 2.2.6.超低溫冷凍櫃：保持$-70\pm 5^{\circ}\text{C}$者。 2.2.7.水浴：維持水溫溫差在$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.8.培養箱：維持內部溫差$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.9.攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。 2.2.10.離心機：供各式微量離心管離心用。 2.2.11.天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g者，靈敏度為5 mg。 2.2.12.精密天平：靈敏度為0.001 g。 2.2.13.酸鹼度測定儀(pH meter)。 2.2.14.酸鹼度測定試紙：pH值範圍為6～8。	食品微生物之檢驗方法-單核球增多性李斯特菌之檢驗 Method of Test for Food Microbiology—Test of <i>Listeria monocytogenes</i> 1.適用範圍：本方法適用於禽畜肉、蛋及蛋製品等中單核球增多性李斯特菌之檢驗，<u>惟乳品除外</u>。 2.檢驗方法： 2.1.工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好，操作平臺光度為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：維持內部溫差$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.5.水浴：維持水溫溫差在$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.6.攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：<u>能</u>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。 2.2.8. pH測定儀。 2.2.9.旋渦混合器(Vortex mixer)。 2.2.10.加熱器。 2.2.11.顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。 2.2.12.光源：一般日光燈。 2.2.13.吸管或自動吸管/吸管尖：已滅菌。1mL吸管應有0.01 mL之刻度、5及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。 2.2.14. 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。	一、修正英文標題。 二、增列部分器具及材料、試藥及試劑。 三、新增並修正部分試劑之配製。 四、採檢量增至五倍以提升檢出率(蛋/蛋製品除外)。 五、於 UVM 增菌培養後採二支線進行選擇性培養。 六、增加使用市售選擇性呈色培養基之使用建議。 七、變更醣類利用試驗之培養基之選用之及修正其製備流程。 八、新增 CAMP 試驗注意事項。 九、新增菌種保存之步驟。 十、增列第二部：單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢測。 十一、增列檢驗

2.2.15. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。 2.2.16. 加熱器。 2.2.17. 攪拌器。 2.2.18. 振盪器 (Shaker)。 2.2.19. 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。 2.2.20. 光源：一般日光燈。 2.2.21. 吸管或自動吸管/吸管尖：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。 2.2.22. 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。 2.2.23. 增菌用容器：無菌袋或有 90 mL、99 mL、500 mL 及 1000 mL，標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。 2.2.24. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm 試管或其他合適者。 2.2.25. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。 2.2.26. 無菌棉花棒。 2.2.27. 載玻片及蓋玻片：用於染色及鏡檢用。 2.2.28. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.29. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。 2.2.30. 馬克法蘭氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。 2.2.31. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 7 × 20 mm 或其他適當規格，使用時倒置於 16 × 150 mm 試管內。 2.2.32. 吸管輔助器(Pipette aid)。 2.2.33. 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 刻度。 2.2.34. 微量吸管(Micropipette)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.35. 吸管尖(Tip)：已滅菌，10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.36. 無菌冷凍試管。 2.2.37. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。	2.2.15. 增菌用容器：無菌袋或有 450 mL、99 mL、90 mL 標記附蓋(栓)之廣口瓶。 2.2.16. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm 試管或其他合適者。 2.2.17. 無菌濾膜：0.45 μm 或以下孔徑之親水性醋酸纖維膜。 2.2.18. 無菌棉花棒。 2.2.19. pH 試紙：pH 值範圍為 6~8。 2.2.20. 載玻片及蓋玻片：能於染色、鏡檢時，載(蓋)菌用之載(蓋)玻片。 2.2.21. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線，或可拋棄式者。 2.2.22. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式。 2.2.23. 馬克法蘭氏濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)。 2.2.24. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 7 × 20 mm 或其他適當規格，使用時倒置於 16 × 150 mm 試管內。	流程圖。 十二、修正部分敘述文字以免誤解。
--	---	-------------------------------------

2.2.38.褐色試藥瓶。

2.2.39.試驗菌株：

Staphylococcus aureus (ATCC 49444, BCRC 14980 ; ATCC 25923, BCRC 10781)

Rhodococcus equi (ATCC 6939, BCRC 12859)

Listeria monocytogenes (ATCC 19111, BCRC 14845)

Listeria innocua (ATCC 33090, BCRC 14843)

2.2.40.試藥：

無水磷酸二氫鉀(KH_2PO_4 ; anhydrous)、無水磷酸氫二鈉(NaH_2PO_4 ; anhydrous)、粟糖苷(esculin)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、氯化鋰(lithium chloride)、萘利啶酸鈉鹽(nalidixic acid, sodium salt)、腸黏菌素(colistin methane sulfonate)、吡啶黃素(acriflavin-HCl)、95%乙醇、氯化鈉、甘露糖醇(mannitol)、葡萄糖(glucose)、硝酸鉀(無亞硝酸鹽者)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、鼠李糖(rhamnose)、木糖(xylose)、麥芽糖(maltose)、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、30%過氧化氫溶液、磺胺酸(sulfanilic acid)、冰醋酸、N-(1-萘基) 乙 烯 二 胺 鹽 酸 鹽

[N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride]、甲基紅(methyl red)、 α -萘酚(α -naphthol)、無水乙醇、拉他頭孢(sodium moxalactam)、氫氧化鉀、鋅粉、 α -肌酸(α -creatine)、甘油、乳化劑 tween 80 及 N,N,N',N'-四甲基對-苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine · 2HCl)均採用化學試藥級。酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef exteact)、蛋白胨(peptone)、洋菜(agar)、胰化蛋白胨(tryptone)、胰化酪蛋白胨(tryptocase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胨蛋白胨(proteose peptone)、雷藍可粉末(Lab lemco

2.2.25.試驗菌株：

Staphylococcus aureus (ATCC 49444, BCRC 14980 ; ATCC 25923, BCRC 10781) ,

Rhodococcus equi (ATCC 6939, BCRC 12859) ,

Listeria monocytogenes (ATCC 19111, BCRC 14845)。

Listeria innocua (ATCC 33090, BCRC 14843)。

2.2.26.試藥：無水磷酸二氫鉀、無水磷酸氫二鈉、丙酮酸鈉鹽、粟糖苷(esculin)、檸檬酸鐵銨、氯化鋰(lithium chloride)、萘利啶酸鈉鹽(nalidixic acid, sodium salt)、腸黏菌素(colistin methane sulfonate)、吡啶黃素(acriflavin)、95%乙醇、澱粉、氯化鈉、甘露糖醇、葡萄糖、酚紅、硝酸鉀、磷酸氫二鉀、溴甲酚紫(bromocresol purple)、鼠李糖(rhamnose)、綿羊血、木糖(xylose)、麥芽糖、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、碘化鉀、磷酸鉀、碘、沙黃 O (safranin O)、氫氧化鈉、30%過氧化氫溶液、磺胺酸(sulfanilic acid)、醋酸、N-(1-萘基) 乙 烯 二 胺 鹽 酸 鹽

[N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride]、甲基紅、 α -萘酚(α -naphthol)、無水酒精、sodium(或 ammonium) moxalactam、氫氧化鉀、鋅粉、 α -肌酸(α -creatine)、N,N,N',N'-四甲基對-苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine · 2HCl)均採用化學試藥級。酵母抽出物、牛肉抽出物、月示蛋白胨、蛋白胨、洋菜、胰化酪蛋白胨、植物蛋白胨、蛋白胨 3 號、緩衝蛋白胨粉末、小牛腦浸出物、牛心浸出物、去血纖維蛋白綿羊血(defibrinated sheep blood)、去血纖維蛋白馬血(defibrinated horse blood)均採用微生物級。

powder)、小牛腦浸出物(Calf Brain Infusion)、牛心浸出物(Beef heart infusion)、哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base)、去血纖維蛋白綿羊血(defibrinated sheep blood)及去血纖維蛋白馬血(defibrinated horse blood)均採用微生物級。 2.2.41.試劑 2.2.41.1.革蘭氏染色液(Gram stain solutions) (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) 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 秒鐘後, 加水 1 mL 研磨, 次加水 5 mL 研磨, 再加水 10 mL, 研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中, 將此溶液注入褐色瓶中, 再以適量水洗滌研鉢及杵後, 以此洗液併入, 使溶液達 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, 供作複染原液。使用時, 取原液 10 mL, 加水 90 mL, 作為複染液。 2.2.41.2. 3%過氧化氫溶液 取 30%過氧化氫溶液 5 mL, 加入無菌水 45 mL 中, 置於褐色瓶中, 冷藏備用。 2.2.41.3. 0.85%無菌生理食鹽水(Physiological saline solution) 取氯化鈉 8.5 g, 溶於水 1000 mL, 以 121℃滅菌 15 分鐘。 2.2.41.4. 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液 取磷酸氫二鉀 17.4 g, 溶於水 500 mL, 調整 pH 值為 6.0, 再加水至 1000 mL, 經 121℃滅菌 15 分鐘後, 貯存於冰箱中備用。 2.2.41.5. 1%腸黏菌素溶液(1% Colistin solution) 取腸黏菌素 1 g, 溶於 0.1 M 之磷酸鉀緩衝溶液 100 mL, 存於冰箱備用。 2.2.41.6. 2%萘利啉酸溶液(2% Nalidixic	2.2.27.試劑: 2.2.27.1.革蘭氏染色液(Gram stain solutions)^(註) (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 中。 溶液 B: 取草酸銨 0.8 g 溶於水 80 mL 中。 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) 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 秒鐘後, 加水 1 mL 研磨, 次加水 5 mL 研磨, 再加水 10 mL, 研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中, 將此溶液注入褐色瓶中, 再以適量水洗滌研鉢及杵後, 以此洗液併入, 使溶液達 300 mL。 (3) 哈克氏複染液(複染劑): 取沙黃 O 2.5g 溶於 95%乙醇 100 mL 中, 供作複染原液。使用時, 取原液 10 mL 加水 90 mL, 作為複染液。 2.2.27.2. 3%過氧化氫溶液: 取 30%過氧化氫溶液 5 mL 加入無菌水 45 mL 中, 置於褐色瓶中, 冷藏備用。 2.2.27.3. 無菌生理食鹽水(Physiological saline solution): 取氯化鈉 8.5 g 溶於水 1000 mL 中, 以 121℃滅菌 15 分鐘。 2.2.27.4. 磷酸鹽緩衝溶液: 取磷酸二氫鉀 34 g 溶於水 500 mL 中, 以 1N 氫氧化鈉溶液調節 pH 值為 7.2, 再加水至全量為 1000 mL, 經 121℃滅菌 15 分鐘後, 貯存於冰箱中, 做為原液備用。使用時, 取原液 1.25 mL 加水至 1000 mL, 分裝於稀釋用容器中, 經 121℃滅菌 15 分鐘後, 調最終 pH 值為	
--	--	--

acid solution) 取萘利啶酸鈉鹽 2.0 g, 溶於水 100 mL, 過濾除菌, 冷藏備用。 <u>2.2.41.7. 拉他頭孢溶液 (Moxalactam solution)</u> 取拉他頭孢 1 g, 溶於 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液 100 mL, 過濾除菌, 分取 2 mL, 注入試管內, 貯存於冰箱備用。 <u>2.2.41.8. 亞硝酸鹽試驗試劑 (Nitrite detection reagent)</u> 溶液 A: 取磺胺酸 1 g, 溶於 5N 醋酸溶液 125 mL, 冷藏備用。 溶液 B: 取 N-(1-萘基) 乙烯二胺鹽酸鹽 0.25 g, 溶於 5N 醋酸溶液 200 mL, 冷藏備用。 <u>2.2.41.9. 甲基紅指示劑 (Methyl red indicator)</u> 取甲基紅 0.1 g, 溶於 95% 乙醇 300 mL, 再加入水 200 mL, 冷藏備用。 <u>2.2.41.10. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer reagents, VP reagent)</u> 溶液 A: 取 α-萘酚 5 g, 溶於無水乙醇 100 mL, 冷藏備用。 溶液 B: 取氫氧化鉀 40 g, 溶於水 100 mL, 冷藏備用。 <u>2.2.41.11. 氧化酶試劑 (Oxidase reagent)</u> 取 N,N,N',N'-四甲基對-苯二胺鹽酸鹽 1 g, 溶於水 100 mL, 置入褐色瓶中, 冷藏備用。 <u>2.2.41.12. 5N 醋酸溶液</u> 取冰醋酸 286 mL, 加去離子水使成 1000 mL。 <u>2.2.41.13. 4% 去血纖維蛋白馬血 (或綿羊血)</u> 取無菌去纖維蛋白馬血 (或綿羊血) 20 g, 加蒸餾水溶解使成 500 mL。 <u>2.2.41.14. 0.25 % 吡啶黃素溶液</u> 稱取吡啶黃素 25 mg, 加蒸餾水溶解使成 10 mL, 再以無菌濾膜過濾。 <u>2.2.41.15. 5% 檸檬酸鐵胺溶液</u> 稱取檸檬酸鐵胺 250 mg, 加蒸餾水溶解使成 5 mL, 再以無菌濾膜過濾。 <u>2.2.41.16. 5% 木糖溶液</u> 稱取木糖 25 g, 加蒸餾水溶解使成 500 mL, 再以無菌濾膜過濾。	<u>7.2±0.1。</u> <u>2.2.27.5. 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 6.0)</u>: 取磷酸鉀 17.6 g, 溶於水 500 mL 中, 調整 pH 值為 6.0, 再加水至全量為 1000 mL, 經 121°C 滅菌 15 分鐘後, 貯存於冰箱中備用。 <u>2.2.27.6. 1% 腸黏菌素溶液</u>: 取腸黏菌素 1 g, 溶於 pH 6.0, 0.1M 之磷酸鉀緩衝溶液 100 mL, 存於冰箱備用。 <u>2.2.27.7. 2% 萘利啶酸溶液 (2% Nalidixic acid solution)</u>: 取萘利啶酸鈉鹽 2.0 g 溶於水 100 mL 中, 過濾除菌, 冷藏備用。 <u>2.2.27.8. 氫氧化鉀溶液</u>: 取氫氧化鉀 2.5 g 及氯化鈉 20 g 溶於水 500 mL 中, 以 1N 氫氧化鈉溶液調節 pH 值為 12.3, 再加水至 1000 mL, 經 121°C 滅菌 15 分鐘後, 貯存於室溫備用。 <u>2.2.27.9. Moxalactam 溶液</u>: 取 sodium (或 ammonium) moxalactam 1 g 溶於 pH 6.0, 0.1 M 之磷酸鉀緩衝溶液 100 mL, 以過濾除菌, 分取 2 mL 注入試管內, 貯存於冰箱備用。 <u>2.2.27.10. 亞硝酸鹽偵檢試劑 (Nitrite detection reagents)</u>: 試液 A: 取磺胺酸 1 g 溶於 5N 醋酸 125 mL 中, 冷藏備用。 試液 B: 取 N-(1-萘基) 乙烯二胺鹽酸鹽 0.25 g 溶於 5N 醋酸 200 mL 中, 冷藏備用。 <u>2.2.28.11. 甲基紅指示劑 (Methyl red indicator)</u>: 取甲基紅 0.1 g 溶於 95% 乙醇 300 mL 後, 再加入水 200 mL, 冷藏備用。 <u>2.2.28.12. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer reagents, VP reagents)</u>: 試液 A: 取 α-萘酚 5 g 溶於無水酒精 100 mL 中, 冷藏備用。 試液 B: 取氫氧化鉀 40 g 溶於水 100 mL 中, 冷藏備用。 <u>2.2.28.13. 氧化酶試劑 (Oxidase reagent)</u>: 取 N,N,N',N'-四甲基對-苯二胺鹽酸鹽 1g 溶於蒸餾水 100 mL 中, 置入褐色瓶中, 冷藏備用。	
---	--	--

2.2.41.17. 5% 鼠李糖溶液

稱取鼠李糖 25 g，加蒸餾水溶解使成 500 mL，再以無菌濾膜過濾。

2.2.42. 培養基

2.2.42.1. UVM 培養液(UVM broth)

胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	5.0 g
雷藍可粉末 (Lab lemco powder)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
氯化鈉	20.0 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.35 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)	12.0 g
粟糖甘(esculin)	1.0 g
2% 萘利啶酸溶液 (2% Nalidixic acid solution)	1.0 mL
吡啶黃素(acriflavin-HCl)	12.0 mg
蒸餾水	1000 mL

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。

2.2.42.2. 費氏培養液(Fraser broth)

胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
雷藍可粉末 (Lab lemco powder)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
氯化鈉	20.0 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.35 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)	12.0 g
粟糖甘(esculin)	1.0 g
2% 萘利啶酸溶液 (2% Nalidixic acid solution)	1.0 mL
氯化鋰(lithium chloride)	3.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，量取 10 mL，分裝於 20 × 150 mm 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，貯存冰箱中備用。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。

2.2.28. 培養基

2.2.28.1. UVM 培養液(UVM broth)

胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	5.0 g
雷藍可粉末 (Lab lemco powder)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.35 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	12.0 g
粟糖甘(esculin)	1.0 g
2% 萘利啶酸(nalidixic acid)	1.0 mL
吡啶黃素(acriflavin)	12.0 mg
蒸餾水	1000 mL

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。

2.2.28.2. 費氏培養液(Fraser broth)

胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	5.0 g
雷藍可粉末 (Lab lemco powder)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.35 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	12.0 g
粟糖甘(esculin)	1.0 g
2% 萘利啶酸(nalidixic acid)	1.0 mL
氯化鋰(LiCl)	3.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，量取 10 mL，分裝於 20 × 150 mm 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，貯存冰箱中備用。使用前於每支試管內加入已過濾除菌之吡啶黃素 0.1 mL (2.5 mg/mL) 及 5% 之檸檬酸鐵銨溶液(ferric ammonium citrate solution) 0.1 mL。

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

哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base)	39 ~ 44 g(視廠牌而定)
洋菜(agar)	2.0 g
粟糖苷(esculin)	1.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
氯化鋰(lithium chloride)	15.0 g
1%腸黏菌素溶液(1% colistin solution)	1.0 mL
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.2，並用恆溫水浴方式，迅速冷卻至 46℃，同時加入已過濾除菌之拉他頭孢溶液 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）。

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

底層

哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base)	39 ~ 44 g(視廠牌而定)
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，置於 46℃水浴中備用。

上層

將 4%去血纖維蛋白馬血(或綿羊血)加入 46℃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，加入培養皿中，凝固後再倒入上層培養基 5~6 mL，貯存於冰箱備用，培養基顏色改變，應予捨棄。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone)	15.0 g
植物蛋白胰(phytone peptone)	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰溶解後，以 121℃滅菌 15 分

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

哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base)	39 ~ 44 g(視廠牌而定)
洋菜(agar)	2.0 g
粟糖苷(esculin)	1.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
氯化鋰(LiCl)	15.0 g
1%腸黏菌素溶液(colistin solution)	1.0 mL
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.2，並用恆溫水浴方式，迅速冷卻至 46℃，同時加入已過濾除菌之 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）。

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

底層

哥倫比亞血液基礎培養基	44.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，置於 46℃水浴中備用。

上層

將 4%去血纖維蛋白馬血(或綿羊血)加入 46℃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 加入培養皿中，凝固後再倒入上層培養基 5~6 mL，貯存於冰箱備用，培養基顏色改變，應予捨棄。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone)	15.0 g
植物蛋白胰(phytone peptone)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰溶解後，以 121℃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。

2.2.42.6. 紫色碳水化合物培養液(Purple carbohydrate broth)

胨蛋白胨(proteose peptone)	10.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	1.0 g
氯化鈉	5.0 g
溴甲酚紫(bromocresol purrple)	0.02 g
蒸餾水	1000mL

葡萄糖、粟糖甘、麥芽糖、甘露糖醇利用試驗用培養液：

分別取葡萄糖、粟糖甘、麥芽糖及甘露糖醇 5 g，溶解於上述之培養液後，取 2.5 mL，分裝入 13×100 mm 試管內，以 118°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

鼠李糖(rhamnose)、木糖(xylose)利用試驗用培養液：

分別取已過濾滅菌之 5% 鼠李糖溶液及 5% 木糖溶液，加入已滅菌、分裝之紫色碳水化合物培養液，使其最終濃度為 0.5%。

2.2.42.7. 腦心浸出物培養基(Brain heart infusion agar, BHI agar)

小牛腦浸出物(calf brain infusion)	7.7 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	9.8 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	5.0 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.0 g
洋菜	15.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰完全溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。培養基注入培養皿前，應搖動混勻，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿倒入 15~20 mL，凝固後打開皿蓋 1/2~1/4，使培養基表面乾燥，已注入培養皿之培養基以當天使用為佳，在冰箱中貯存者應注意有無雜菌污染。

鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 ，分裝於試管者作成斜面培養基。

2.2.28.6. 發酵培養液 (Fermentation broth)

基礎發酵培養液

蛋白胨(peptone)	10.0 g
雷藍可粉末 (Lab lemco powder)	1.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
酚紅溶液(360 mg / 20 mL 0.1 N NaOH)	1.0 mL
蒸餾水	900mL

混合溶解、調整 pH 值為 7.4，再以 121°C 滅菌 15 分鐘。

碳水化合物溶液 5 %

木糖(xylose)

甘露糖醇(mannitol)

鼠李糖(rhamnose)

分別過濾除菌後備用，使用時取基礎發酵培養液 900 mL 及各種碳水化合物溶液 100 mL 分別混合。以無菌操作分裝至 10×100 mm 無菌螺旋蓋試管中，每支約 5 mL，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 (25°C)。

2.2.28.7. 腦心浸出物培養基(Brain heart infusion agar, BHI agar)

小牛腦浸出物(calf brain infusion)	200.0 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.0 g
洋菜	15.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰完全溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。培養基注入培養皿前，應搖動混勻，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿倒入 15~20 mL，凝固後打開皿蓋 1/2~1/4，使培養基表面乾燥，已注入培養皿之培養基以當天使用為佳，在冰箱中貯存者應注意有無雜菌污染。

2.2.42.8. 腦心浸出物培養液(Brain heart infusion broth, BHI broth)

小牛腦浸出物(calf brain infusion)	7.7 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	9.8 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	5.0 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 ; anhydrous)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。已注入試管之培養液以當天使用為佳，在冰箱中貯存者於使用前應注意有無雜菌污染。

2.2.42.9. CAMP 測試培養基(CAMP test agar)

(含 5%去血纖維蛋白綿羊血之胰化酪蛋白大豆培養基)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15.0 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	950 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.30±0.2，待冷卻至 50℃，加入去血纖維蛋白綿羊血 50 mL，混合均勻，於每一培養皿倒入 15~20 mL，培養基注入培養皿前，應搖動混勻，搖動時應避免產生汽泡。貯藏於冰箱備用，顏色發生變化者，應予捨棄。

2.2.42.10.胰化酪蛋白大豆酵母抽出物培養基(Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract, TSAYE)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15.0 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g
氯化鈉	5.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	6.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最

2.2.28.8.腦心浸出物培養基(Brain heart infusion broth, BHI broth)

小牛腦浸出物(calf brain infusion)	200.0 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。已注入試管之培養液以當天使用為佳，在冰箱中貯存者於使用前應注意有無雜菌污染。

2.2.28.9. CAMP 測試培養基(CAMP test agar)

添加 5%之去血纖維蛋白綿羊血於胰化酪蛋白大豆培養基(TSA)中，混合均勻，再取 8 mL 加入培養皿中，貯藏於冰箱備用，顏色發生變化者，應予捨棄。

2.2.28.10.胰化酪蛋白大豆酵母抽出物培養基(Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract, TSAYE)

胰化酪蛋白大豆培養基粉末(trypticase soy agar, dehydrated)	40 g
酵母抽出物(yeast extract)	6.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，

終 pH 值為 7.3 ± 0.2 ，每一培養皿倒入 15 ~ 20 mL，培養基注入培養皿前，應搖動混勻，搖動時應避免產生汽泡。

2.2.42.11.胰化酪蛋白大豆酵母抽出物培養液(Trypticase soy broth with 0.6% yeast extract, TSBYE)

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone)	17.0 g
植物蛋白胰(phytone peptone)	3.0 g
氯化鈉	5.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.5 g
酵母抽出物(yeast extract)	6.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.42.12.硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白胰(peptone)	5.0 g
硝酸鉀	1.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱煮沸至完全溶解後，分取 5~7 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 12~15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.2.42.13.葡萄糖培養液(Glucose broth, MR-VP broth)

胰蛋白胰(proteose peptone)	7.0 g
葡萄糖(glucose)	5.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5.0 g
洋菜(agar)	5.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 ，每一培養皿倒入 15 ~ 20 mL，培養基注入培養皿前，應搖動混勻，搖動時應避免產生汽泡。

2.2.28.11.硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白胰(peptone)	5.0 g
硝酸鉀	1.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱煮沸至完全溶解後，分取 5~7 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 12~15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1 。

2.2.28.12.葡萄糖培養液(Glucose broth, MR-VP broth)

胰蛋白胰(proteose peptone)	7.0 g
葡萄糖(glucose)	5.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5.0 g
洋菜(agar)	5.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9 ± 0.2 。

2.2.28.13.葡萄糖溴甲酚紫培養液(Glucose bromcresol purple broth)

葡萄糖(glucose)	2.0 g
蛋白胰(peptone)	10.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.04 g
蒸餾水	1000mL

加熱溶解後，再分取 8 mL 注入已裝有

2.2.42.14. 運動性測試培養基 (Motility test medium, MTM)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	5.0 g
洋菜(agar)	4.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱攪拌沸騰溶解後，分取 5 mL 注入 10 × 100 mm 附蓋(栓)試管內，經 121℃ 滅菌 15 分鐘後，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.42.15. 營養培養基(Nutrient agar)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管內，經 121℃ 滅菌 15 分鐘後，作成斜面培養基，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.3.檢液之處理^(註 1 及 2)

2.3.1. 固態檢體先適當切碎，混合均勻後，分別從其中取 5 份檢體(每份檢體取 25 g)，將 5 份檢體混合成 125 g，加入已滅菌之 UVM 培養液 1125 mL 中，用鐵胃拍打或用已滅菌之攪拌均質器以低速攪拌均質，均質時間不超過 2 分鐘，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混勻，分別從其中取 5 份檢體(每份檢體取 25 g)，將 5 份檢體混合成 125 g，加入已滅菌之 UVM 培養液 1125 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.3. 液態檢體搖勻後，取 125 mL，加入已滅菌之 UVM 培養液 1125 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.4. 蛋及蛋製品，先混合均勻後，取 25 g，加入已滅菌之 UVM 培養液 225 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.5. 冷凍檢體須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5℃，18 小時內即可解凍

發酵管之試管內，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。

2.2.28.14. 運動性測試培養基 (Motility test medium, MTM)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
洋菜(agar)	4.0 g
蒸餾水	1000mL

加熱攪拌沸騰溶解後，分取 5 mL 注入 10 × 100 mm 附蓋(栓)試管內，經 121℃ 滅菌 15 分鐘後，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.28.15. 營養培養基(Nutrient agar)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	5 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管內，經 121℃ 滅菌 15 分鐘後，作成斜面培養基，最終 pH 值為 6.8±0.2。

2.3.檢液之處理^(註 1 及 註 2)

2.3.1. 固態檢體先適當切碎，混合均勻後，取 25 g 加入已滅菌之 UVM 培養液 225 mL 中，用已滅菌之攪拌均質器以低速攪拌，攪拌時間不超過 2 分鐘，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混勻，取 25 g 加入已滅菌之 UVM 培養液 225 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.3. 液態檢體搖勻後，取 25 mL 加入已滅菌之 UVM 培養液 225 mL 中，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.4. 冷凍檢體須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5℃，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍

完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(即放在 45℃ 以下之水浴中，可於 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體之解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依照 2.3.1 節方法，製成 10 倍稀釋檢液。如測試檢體工作無法於一小時內開始進行，檢體應勿先添加稀釋液，並貯存在 -10℃ 以下的環境中。

2.3.6. 塗抹物檢體：以無菌操作折斷塗抹物木柄或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹物之頭部置於無菌含蓋試管內，添加已滅菌之 UVM 培養液 5 mL，將試管蓋旋緊，於 10 秒內來回扣擊手心使其劇烈震盪(震盪幅度需達 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. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體，加入適量經 121℃ 滅菌 15 分鐘之乳化劑(tween 80)，使其於檢液中濃度為 1%，並充分振搖，使之乳化。

註 2. 檢體總量不足 125 g (mL) 時，則添加適量之增菌液作成 10 倍稀釋檢液。

2.4. 鑑定試驗

2.4.1. 增菌培養

2.4.1.1. 一次增菌培養：將第 2.3 節之檢液充分振搖，混合均勻後，於 30℃ 培養箱中培養 23~26 小時，接續 2.4.2.1。

2.4.1.2. 二次增菌培養：以無菌吸管取 2.4.1.1 節之增菌液 0.1 mL 至 10 mL 費氏培養液中，置於 35℃ 培養箱，培養 24~28 小時，接續 2.4.2.2 節。塗抹物檢體，則取增菌液 1 mL 至 10 mL 費氏培養液，置於 35℃ 培養 24~48 小時。

2.4.2. 分離培養

2.4.2.1. 將 2.4.1.1 節之一次增菌培養液以無菌棉花棒沾取，塗佈於 MOX 培養基的 1/2 部份，再以接種環進行二區劃

(即放在 45℃ 以下之水浴中，可於 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體之解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依照 2.3.1 節方法，製成 10 倍稀釋檢液。如測試檢體工作無法於一小時內開始進行，檢體應勿先添加稀釋液，並貯存在 ≤ -10℃ 環境中。

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 25g (mL)，以下步驟同 2.3.1 節之操作。

2.3.6. 塗抹物檢體：以無菌操作折斷塗抹物木柄或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹物之頭部置於無菌含蓋試管內，添加已滅菌之 UVM 培養液 5 mL 後，將試管蓋旋緊，於 10 秒內來回扣擊手心使其劇烈震盪(震盪幅度需達 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. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之滅菌乳化劑(如 Tween 80 等)，並充分振搖，使之乳化。

註 2. 檢體總量不足 25 g (mL) 時，則添加適量之增菌液作成 10 倍稀釋檢液。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 增菌培養：將第 2.3 節之檢液充分振搖，混合均勻後，於 30±2℃ 培養箱中培養 22 小時，以無菌吸管取 0.1 mL 增菌液至 10 mL 費氏培養液中，置於 35±2℃ 培養箱，培養 26 小時。塗抹物檢體，則取 1 mL 增菌液至 10 mL 費氏培養液，置於 35℃ 培養 24±2 小時。

2.4.2. 分離培養：李斯特菌存在時，費氏培養液因果糖苷的利用而產生黑變。故將有黑變的費氏培養液試管以無菌棉花棒沾取，塗佈於 MOX 培養基的 1/2 部份，再以接種環進行二區劃線(圖

線(圖一)，置於 35℃ 培養箱中培養 24～48 小時。典型李斯特菌於 24～28 小時內菌落周邊即呈現黑環區，典型菌落約 1 mm，但部分生長慢菌株，則需多培養 24 小時。 2.4.2.2. 若 MOX 培養 48 小時後仍無黑變現象，則觀察二次增菌培養液(費氏培養液)有無黑變現象。將有黑變的費氏培養液試管以無菌棉花棒沾取，塗佈於 MOX 培養基的 1/2 部份，再以接種環進行二區劃線(圖一)，置於 35℃ 培養箱中培養 24～48 小時。經 24～28 小時培養之費氏培養液仍無黑變現象時，則需多培養 24 小時，再重覆上述劃菌步驟。倘費氏培養液及 MOX 培養基上之菌株均無因粟糖苷的利用而產生黑變之現象時，可視該檢體內不含李斯特菌，判定檢出為陰性。 2.4.2.3. 除使用 MOX 培養基進行分離，建議同時選用 1 種經確效認可之市售李斯特菌選擇性呈色培養基(chromogenic differential selective agars)，以單核球增多性李斯特菌之生化特性使培養基之呈色質(chromogen)分解而產生之變色現象，有助於區分單核球增多性李斯特菌及其他李斯特菌。 2.4.2.4. 自 2.4.2.1. 或 2.4.2.2. 之 MOX 培養基挑取 5 個以上可疑菌落，接種於 HL 培養基，置於 35℃ 培養 18～26 小時。菌落形成後，將培養皿底部正對光源，觀察透明之溶血現象(beta-hemolysis)，選取 1～3 個小且具溶血圈的菌落，分別接種於 BHI 培養液、TSAYE 培養基及 TSBYE 培養液等非選擇性培養條件，以備進行各生化特性測試用。接種於 BHI broth，需置於 18～25℃ 培養 16～18 小時；接種於 TSAYE 培養基或 TSBYE 培養液，需置於 35℃ 培養 22～26 小時。所有含可疑菌落之 HL 培養基應於室溫或冷藏保持至確認試驗完成。 2.4.2.5. 若使用市售李斯特菌選擇性呈色培養基，則按其使用說明進行培養，挑取典型菌落接種非選擇性培養基培養，以備進行生化鑑定。	一)，置於 35±2℃ 培養箱中培養 24～48 小時。經 24 小時培養之費氏培養液仍無黑變現象時，則需多培養 24 小時，再重覆上述劃菌步驟。典型李斯特菌於 24 小時內菌落周邊即呈現黑環區，典型菌落約 1 mm，但部分生長慢菌株，則需多培養 24 小時，以接種環挑取 20 個直徑約 1 mm 之具黑環區之可以菌落，接種於 HL 培養基，置於 35±2℃，18～26 小時培養。菌落形成後，將培養皿底部正對光源，觀察透明之溶血現象(beta-hemolysis)，選取一～三個小且具溶血圈的菌落，分別並接種於 BHI agar、BHI broth 及斜面營養培養基，置於 18～25℃，16～18 小時培養，以備進行各生化特性測試用。所有含可疑菌落之 HL 培養基應於室溫或冷藏保持至確認試驗完成。倘費氏培養液及 MOX 培養基上之菌株均無因粟糖苷的利用而產生黑變之現象時，可視該檢體內不含李斯特菌。	
--	--	--

2.4.3.初步鑑別試驗 2.4.3.1.運動性試驗：自 2.4.2_節 BHI broth 上<u>鉤</u>菌，以懸滴法(hanging drop)或溼漬法(wet mount)，觀察細菌翻滾運動性，具運動性者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。 2.4.3.2.鏡檢：自 2.4.2_節之 BHI agar 鉤取經培養 24 小時之菌落，作革蘭氏染色後鏡檢，其結果為革蘭氏染色陽性，無芽胞，呈單一或短鏈排列的球桿菌(coccibacilli)，經上述試驗確認為可疑者，則應進行生化反應。 革蘭氏染色步驟如下： (1) 取 16~24 小時培養之菌株，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。 (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗，水洗應不超過 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，再以自來水沖洗，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 秒鐘，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。李斯特菌為革蘭氏陽性，菌體呈單一或短鏈排列的球桿菌，不產芽胞。 2.4.4.確定試驗： 2.4.4.1.傘狀運動試驗(Umbrella motility test)： 自 BHI agar 鉤菌，穿刺培養於運動性測試培養基中約 1/2 深，於 20~25℃ 培養箱中，培養 2~3 天，培養基上緣下 3~5 mm 處呈現傘狀者(圖二)為正反應，否則為負反應。李斯特菌為正反應。 2.4.4.2. CAMP 試驗(CAMP test)： 將試驗菌株 <i>Rhodococcus equi</i> 及 <i>Staphylococcus aureus</i> 接種於 BHI agar 上，培養隔夜後，以經 0.85%無菌生理	2.4.3.初步鑑別試驗： 2.4.3.1.運動性試驗：自 2.4.2 節 BHI broth 上<u>鉤</u>菌，以懸滴法(hanging drop)或溼漬法(wet mount)，觀察細菌翻滾運動性，具運動性者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。 2.4.3.2.鏡檢：自 2.4.2 節之 BHI agar 鉤取經培養 24 小時之菌落，作革蘭氏染色後鏡檢，其結果為革蘭氏染色陽性，無芽胞，呈單一或短鏈排列的球桿菌(coccibacilli)，經上述試驗確認為可疑者，則應進行生化反應。 革蘭氏染色步驟如下： (1) 取 16~24 小時培養之菌株，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。 (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗，水洗應不超過 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，再以自來水沖洗，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 秒鐘，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。李斯特菌為革蘭氏陽性，菌體呈單一或短鏈排列的球桿菌，不產芽胞。 2.4.4.確定試驗： 2.4.4.1.傘狀運動試驗(Umbrella motility test)： 自 BHI agar 鉤菌，穿刺培養於運動性測試培養基中約 1/2 深，於 20~25℃ 培養箱中，培養 2~3 天，培養基上緣下 3~5 mm 處呈現傘狀者(圖二)為正反應，否則為負反應。李斯特菌為正反應。 2.4.4.2. CAMP 試驗(CAMP test)： 將試驗菌株 <i>Rhodococcus equi</i> 及 <i>Staphylococcus aureus</i> 接種於 BHI agar 上，培養隔夜後，以經無菌生理食鹽水	
--	--	--

食鹽水潤濕之棉花棒分別沾取 *R. equi* 及 *S. aureus* 至 0.85% 無菌生理食鹽水，調整菌液濃度至少達馬克法蘭氏濁度值 1.0，再依相同操作調整可疑菌株菌液濃度達馬克法蘭氏濁度值 2.0 以上，再接種於 CAMP 測試培養基上，中間則以接種環接種可疑菌株(圖三)，接種時並不交互重疊，置於 35℃ 培養 24~48 小時後觀察結果，正反應者為相接處會呈現箭形溶血區 (arrow shaped hemolytical zone)，靠近 *S. aureus* 處溶血較多，且近 *R. equi* 處溶血不明顯者是為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。進行 CAMP 試驗時，以新鮮綿羊血培養基為之，並同時以已知單核球增多性李斯特菌菌株作為控制組，做為結果判讀之參考。

2.4.4.3. 觸酶試驗(Catalase test)：

自斜面營養培養基上鈎菌，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，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.4. 氧化酶試驗(Oxidase test)：

自斜面營養培養基上鈎菌，塗抹於滴有氧化酶試劑試紙上，10~15 秒後變為深藍色者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為負反應。

2.4.4.5. 歐普氏試驗(VP test)：

鈎菌接種於 MR-VP 培養液中，並置於 35℃ 培養箱中培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一滅菌試管中，加入歐普氏試劑之溶液 A 0.6 mL 及歐普氏試劑之溶液 B 0.2 mL 後，再加入少許 α -肌酸，振搖均勻，經 4 小時後觀察結果，呈現粉紅色則為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.6. 甲基紅試驗(Methyl red test)：

將 2.4.4.5 節剩餘之 MR-VP 培養液，再培養 48±2 小時後，加入甲基紅指示劑 0.3 mL，輕輕搖勻，仍為紅色者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.7. 醣類利用試驗 (Carbohydrate

潤濕之棉花棒分別沾取 *R. equi* 及 *S. aureus* 至無菌生理食鹽水，調整菌液濃度至少達馬克法蘭氏濁度值 1.0，再依相同操作調整可疑菌株菌液濃度達馬克法蘭氏濁度值 2.0 以上，再接種於 CAMP 測試培養基上，中間則以接種環接種可疑菌株(圖三)，接種時並不交互重疊，置於 35℃，培養 24~48 小時後觀察結果，正反應者為相接處會呈現箭形溶血區 (arrow shaped hemolytical zone)，靠近 *S. aureus* 處溶血較多，且近 *R. equi* 處溶血不明顯者是為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.3. 觸酶試驗(Catalase test)：

自斜面營養培養基上鈎菌，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，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.4. 氧化酶試驗(Oxidase test)：

自斜面營養培養基上鈎菌，塗抹於滴有氧化酶試劑試紙上，10~15 秒後變為深藍色者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為負反應。

2.4.4.5. 歐普氏試驗(VP test)：

鈎菌接種於 MR-VP 培養液中，並置於 35℃ 培養箱中培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一滅菌試管中，加入歐普氏試劑之試液 A 0.6 mL 及歐普氏試劑之試液 B 0.2 mL 後，再加入少許肌酸，振搖均勻，經 4 小時後觀察結果，呈現粉紅色則為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.6. 甲基紅試驗(Methyl red test)：

將 2.4.4.5 節剩餘之 MR-VP 培養液，再培養 48±2 小時後，加入甲基紅指示劑 0.3 mL，輕輕搖勻，仍為紅色者為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.7. 酚紅碳水化合物利用試驗

utilization test)：

自營養斜面培養基上鈎菌，接種於分別含 0.5%鼠李糖、木糖、甘露糖醇、葡萄糖、麥芽糖、或粟糖甘之紫色碳水化合物培養液，於 35℃培養，每隔 24 小時觀察一次，觀察 7 天，培養液顏色轉變為黃色者為正反應，否則為負反應。李斯特菌應為鼠李糖、葡萄糖、麥芽糖、粟糖甘為正反應；木糖及甘露糖醇應為負反應。

2.4.4.8. 硝酸鹽還原反應(Reduction of nitrate)：

自營養斜面培養基上鈎菌接種於硝酸鹽培養液中，並置於 35℃培養箱中，培養 18~24 小時後，各加入亞硝酸鹽試驗試劑之溶液 A 及溶液 B 0.5~1 mL，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色為正反應，顏色無變化時則加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時，則為負反應，李斯特菌為負反應。

2.4.4.9. 菌種保存

若要長期保存，則取 TSB 培養液培養 6~12 小時之菌液 1 mL，加入經 121℃滅菌 15 分鐘之甘油 0.1 mL 至無菌冷凍試管，以液態氮冷凍或立刻置入-70℃冷凍櫃保存。

2.5. 判定：

單核球增多性李斯特菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質	正反應	負反應	單核球增多性李斯特菌之反應
1.生長於 MOX 培養基之典型菌	小菌落，周邊產生黑色沈澱	菌落周邊無黑色沈澱	+

(Phenol red carbohydrate utilization test)：

自營養斜面培養基上鈎菌，分別接種於酚紅鼠李糖培養液，酚紅木糖培養液，酚紅甘露糖醇培養液中，於 35℃培養箱中，培養 48±2 小時，每隔 24 小時觀察一次，培養液顏色由紅色變為黃色為正反應，否則為負反應。李斯特菌反應為鼠李糖培養液正反應，木糖培養液負反應，甘露糖醇培養液負反應。

2.4.4.8. 葡萄糖發酵試驗 (Glucose fermentation test)：

鈎菌接種於葡萄糖溴甲酚紫培養液中，並置於 35℃培養箱中培養 48±2 小時後，顏色由紫色變為黃色，即為正反應，否則為負反應，李斯特菌為正反應。

2.4.4.9. 硝酸鹽還原反應(Reduction of nitrate)：

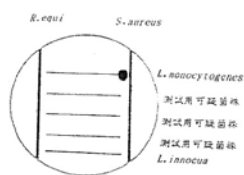
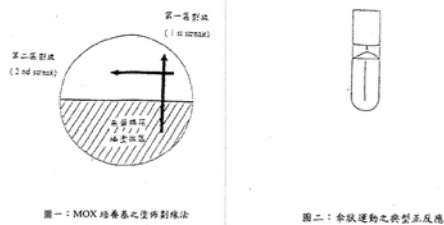
自營養斜面培養基上鈎菌接種於硝酸鹽培養液中，並置於 35℃培養箱中，培養 18~24 小時後，各加入亞硝酸鹽試液 A 及 B 0.5~1 mL，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色為正反應，顏色無變化時則加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時，則為負反應，李斯特菌為負反應。

2.5.判定：

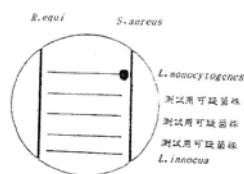
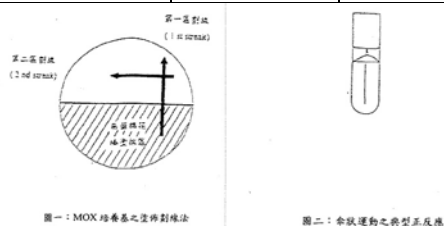
單核球增多性李斯特菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質	正反應	負反應	李斯特菌之反應
1.生長於 MOX 培養基之典型菌落外觀特徵	小菌落，周邊產生黑色沈澱	菌落周邊無黑色沈澱產生	+
2.生長於 Chromogenic	藍色菌落，周邊產生白色	乳白色菌落或	±

落外觀特徵		產生	
2.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	±
3.觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+
4.革蘭氏染色	陽性(深紫色)、無芽孢、短桿菌	無左述現象	+
5.傘狀運動試驗	培養基上緣下3~5 mm 出現傘狀	無左述現象	+
6.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	+
7.硝酸鹽還原反應	紅紫色	原色	-
8.氧化酶試驗	深藍色	非深藍色	-
9.歐普氏試驗	粉紅色	原色	+
10.甲基紅試驗	紅色	黃色	+
11.鼠李糖利用試驗	黃色	紫色	+
12.木糖利用試驗	黃色	紫色	-
13.甘露糖醇利用試驗	黃色	紫色	-
14.粟糖甘利用試驗	黃色	紫色	±
15.葡萄糖利用試驗	黃色	紫色	±
16.麥芽糖利用試驗	黃色	紫色	±
17.β-溶血試驗	具微弱溶血透明現象	無左述現象	+



<i>Listeria</i> 培養基	環	無生長	
3.觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+
4.革蘭氏染色	陽性(深紫色)、無芽孢、短桿菌	無左述現象	+
5.傘狀運動試驗	培養基上緣下3~5 mm 出現傘狀	無左述現象	+
6.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	+
7.硝酸鹽還原反應	紅紫色	原色	-
8.氧化酶試驗	深藍色	非深藍色	-
9.歐普氏試驗	粉紅色	原色	+
10.甲基紅試驗	紅色	黃色	+
11.酚紅鼠李糖利用試驗	黃色	紅色	+
12.酚紅木糖利用試驗	黃色	紅色	-
13.酚紅甘露糖醇利用試驗	黃色	紅色	-
14.葡萄糖發酵試驗	黃色	紫色	±
15.β-溶血試驗	具微弱溶血透明現象	無左述現象	+



2.6.最確數之測定：將 2.3 節之稀釋檢

2.6. 最確數之測定

將 2.3 節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，進行連續稀釋二次，分別吸取 1 mL 檢液及(或)原液，接種於 9 mL UVM 培養液中，各接種三支(稱三階三支)，並於 35~37℃ 培養 24~48 小時後，劃線培養於 MOX 培養基。經由上節各項判定為單核球增多性李斯特菌陽性者之各階(管)數，利用接種量為每管 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)之三階三支最確數表(如附表)，推算出單核球增多性李斯特菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數 (每試管所含檢 體量 g 或 mL)			MPN/ mL (g)	95% 信賴界限		正反應試管數 (每試管所含檢 體量 g 或 mL)			MPN/ mL (g)	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	--

說明：

- (1) 接種量為每試管含檢體(或原液) 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，經 UVM 培養液增菌培養，劃線至 MOX 培養基，並挑選可疑菌落進行生化試驗，確認含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0，對照 MPN 數應為 43，推算出單核球增多性李斯特菌之最確數為 43 (MPN/g 或 MPN/mL)。
- (2) 接種量為每試管含檢體(或原液) 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)，而含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0 時，則該檢體單核球增多性李斯特菌之最確數為 $43 \div 10 = 4.3$ (MPN/g 或 MPN/mL)。
- (3) 接種量為每試管含檢體(或原液) 0.01, 0.001, 0.0001 (g 或 mL)，而含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0 時，則該檢體單核球增多性李斯特菌之

液及(或)原液充分搖勻後，進行連續稀釋二次，分別吸取 1 mL 檢液及(或)原液，接種於 9 mL UVM 培養液中，各接種三支(稱三階三支)，並於 35~37℃ 培養 24~48 小時後，劃線培養於 MOX 培養基。經由上節各項判定為單核球增多性李斯特菌陽性者之各階(管)數，利用接種量為每管 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)之三階三支最確數表(如附表)，推算出單核球增多性李斯特菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數 (每試管所含檢 體量 g 或 mL)			MPN/ mL (g)	95% 信賴界限		正反應試管數 (每試管所含檢 體量 g 或 mL)			MPN/ mL (g)	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	--

說明：

- (1) 接種量為每試管含檢體(或原液) 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，經 UVM 培養液增菌培養，劃線至 MOX 培養基，並挑選可疑菌落進行生化試驗，確認含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0，對照 MPN 數應為 43，推算出單核球增多性李斯特菌之最確數為 43 (MPN/g 或 MPN/mL)。
- (2) 接種量為每試管含檢體(或原液) 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)，而含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0 時，則該檢體單核球增多性李斯特菌之最確數為 $43 \div 10 = 4.3$ (MPN/g 或 MPN/mL)。
- (3) 接種量為每試管含檢體(或原液) 0.01, 0.001, 0.0001 (g 或 mL)，而含有單核球增多性李斯特菌之試管數為 3-1-0 時，則該檢體單核球增多性李斯特菌之最確數為 $43 \times 10 = 4.3 \times 10^2$ (MPN/g 或

最確數為 $43 \times 10 = 4.3 \times 10^2$ (MPN/g 或 MPN/mL)，其餘類推。 2.7.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<u>本檢驗方法</u>為準。 備註：孕婦與潛在的免疫功能不正常的個體禁止接近單核球增多性李斯特菌的檢驗工作區域。 <u>第二部：單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢測</u> 1.適用範圍：本方法適用於單核球增多性李斯特菌之檢驗。 2.檢驗方法：檢體之增菌液或分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)鑑別菌種之方法。 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 $20000 \times g$，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)。	MPN/mL)，其餘類推。 2.7.可參考使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，<u>惟</u>檢驗結果有爭議時，<u>應以傳統方法</u>為準。 備註:孕婦與潛在的免疫功能不正常的個體禁止接近單核球增多性李斯特菌的檢驗工作區域。	
--	---	--

2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。 2.2.11. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。 2.2.12. 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 抽出用：適用於革蘭氏陽性細菌 DNA 抽出之市售套組。 2.3.2. Real-time PCR 用^(註 2) 2.3.2.1 鑑別試驗用引子及探針 2.3.2.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>(標的基因：<i>iap</i> gene) 引子 F：Lm835F 5'-AACTGGTTTCGTTAACGGTAAAT ACTTA-3' 引子 R：Lm998R 5'-TAGGCGCAGGTGTAGTTGCT-3' 探針 P：Lm918P 5'-FAM-CTACTACTCAACAAGCTGCA CCTGCTGC-BHQ-3' PCR 增幅產物大小 163 bp 2.3.2.1.2. <i>Listeria</i> spp.(標的基因：<i>iap</i> gene) 引子 F：Lall1055F 5'-GTTAAAAGCGGTGACACTATTTG G-3' 引子 R：Lall1163R 5'-TTTGACCTACATAAATAGAAGAA GAAGATAA-3' 探針 P：Lall1118P 5'-FAM-ATGTCATGGAATAAT-MGB-3' PCR 增幅產物大小 108 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℃貯存備用，另探針需避光保存，<i>Listeria monocytogenes</i> 之鑑別試驗用探針之 5' 端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3' 採用 Black Hole Quencher-3 (BHQ3)標記；<i>Listeria</i> spp 之鑑別試驗用探針之 5' 端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標		
--	--	--

記，3'採用 Minor Groove Binders (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：單核球增多性李斯特菌標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：10 µL、20 µL、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無 DNase 污染。

2.5. Real-time PCR 溶液^(註 4)

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 鑑別試驗用

<u>5 µM 引子 F</u>	<u>2.0 µL</u>
<u>5 µM 引子 R</u>	<u>2.0 µL</u>
<u>5 µM 探針</u>	<u>1.0 µL</u>
<u>TaqMan® Fast Reagents Starter Kit</u>	<u>12.5 µL</u>
<u>檢體 DNA 溶液</u>	<u>5.0 µL</u>
<u>無菌去離子水</u>	<u>2.5 µL</u>
<u>總體積</u>	<u>25.0 µL</u>

註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6 檢體 DNA 溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部 2.4.1. 節增菌液中吸取菌液 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，震盪混合均勻，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，震盪混合均勻，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℃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℃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，震盪混合均勻，以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液。依 2.6.1.1. 節或 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

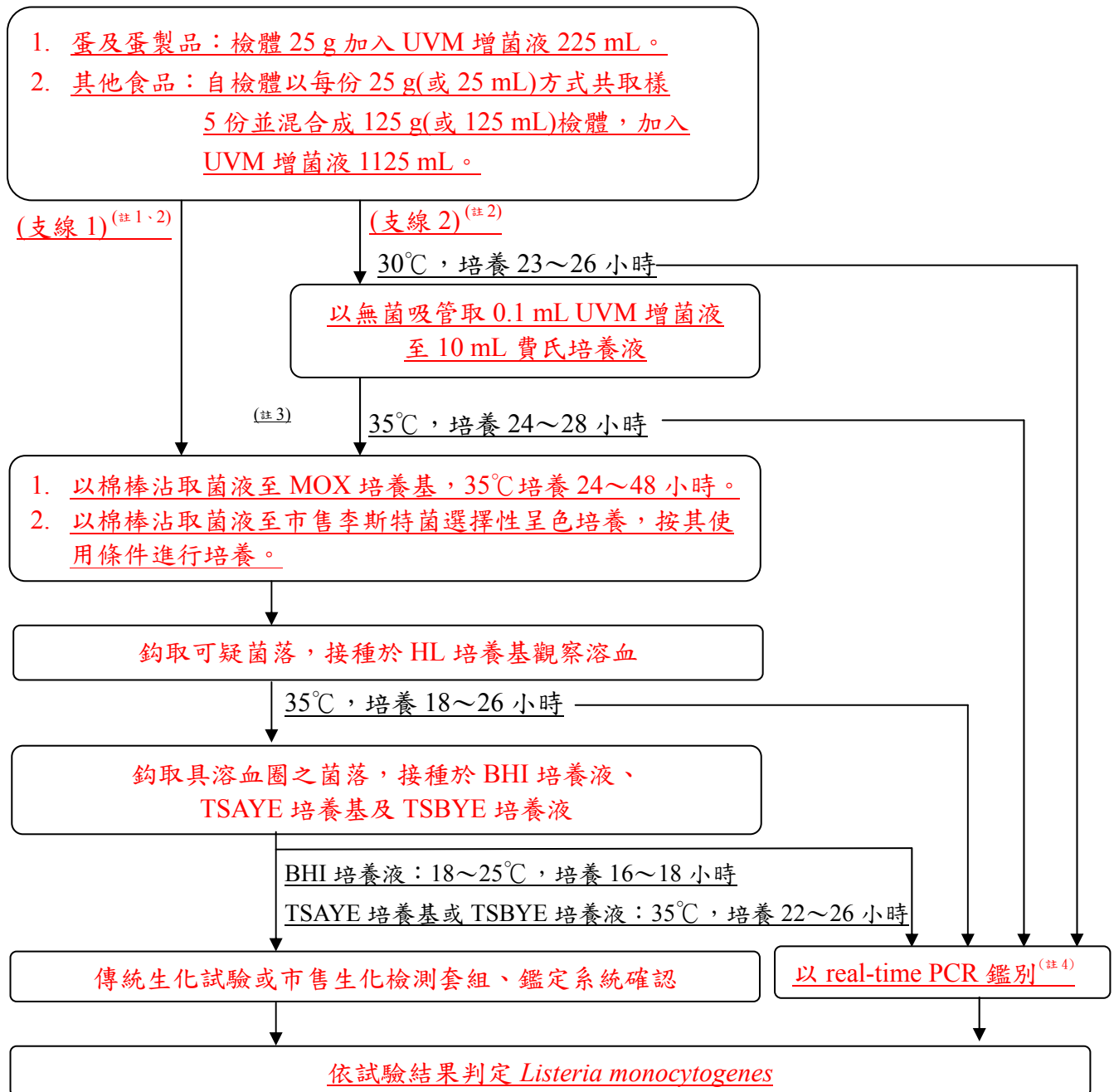
以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5.節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μL 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 200 × g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

2.7.1.1. Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 反應條件

步驟	溫度	時間
1.熱活化	95°C	20 sec
2.變性	95°C	5 sec

3.黏接 <u>Listeria monocytogenes</u> 60°C 30 sec <u>Listeria spp.</u> 60°C 30 sec <u>步驟2 至步驟3,共進行45個循環反應。</u> 2.7.2.Real-time PCR 螢光分析 <u>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。</u> 2.7.3.確認 <u>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 <i>Listeria monocytogenes</i> 及 <i>Listeria spp.</i>之正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有 <i>Listeria monocytogenes</i>。</u> <u>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。</u> <u>附註：第二部單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。</u>		
---	--	--

檢驗流程圖



註 1：檢驗支線 1、2 皆需要同時進行。

註 2：當支線 1 未檢出時，則改以支線 2 為主檢驗流程。

註 3：當支線 1、2 檢出皆為陰性，則判定為陰性。

註 4：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。