

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。
 - 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. 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 刻度。
 - 2.2.8. 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。
 - 2.2.9. 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。
 - 2.2.10. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm 試管或其他適用者。
 - 2.2.11. 培養箱：維持內部溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.12. 水浴：維持水溫溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.13. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作

者。

- 2.2.14. 離心機：供各式微量離心管離心用。
- 2.2.15. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.16. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈱或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.17. 無菌棉花棒。
- 2.2.18. 載玻片及蓋玻片：用於染色及鏡檢用。
- 2.2.19. 光源：一般日光燈。
- 2.2.20. 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。
- 2.2.21. 精密天平：靈敏度為 0.001 g。
- 2.2.22. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.23. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.24. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
- 2.2.25. 酸鹼度測定試紙：pH 值範圍為 6~8。
- 2.2.26. 加熱器。
- 2.2.27. 攪拌器。
- 2.2.28. 振盪器(Shaker)。
- 2.2.29. 吸管輔助器(Pipette aid)。
- 2.2.30. 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。
- 2.2.31. 微量吸管(Micropipette)：10 μL 、20 μL 、200 μL 及 1000 μL 。
- 2.2.32. 吸管尖(Tip)：已滅菌，10 μL 、20 μL 、200 μL 及 1000 μL 。
- 2.2.33. 顯微鏡：放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。
- 2.2.34. 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。
- 2.2.35. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.36. 無菌冷凍試管。
- 2.2.37. 褐色試藥瓶。

2.2.38. 試驗菌株：

Staphylococcus aureus (ATCC49444; BCRC14980) ，

Rhodococcus equi (ATCC6939; BCRC12859) ，

Listeria monocytogenes (ATCC19111; BCRC14845) 。

2.2.39. 試藥：

無水磷酸二氫鉀(KH_2PO_4 ；anhydrous)、無水磷酸氫二鈉(NaH_2PO_4 ；anhydrous)、丙酮酸鈉鹽(sodium pyruvate)、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)、環己胺(cycloheximide)、大腸菌素硫酸鹽(colistin sulfate)、吡啶黃素(acriflavin-HCl)、頭孢泰坦(cefoteam)、弗斯弗黴素(fosfomycin)、95%乙醇、氯化鈉、甘露糖醇(mannitol)、葡萄糖(glucose)、酚紅(phenol red)、多黏桿菌素 B 硫酸鹽(polymyxin B sulfate)、西他利汀(ceftazidime)、硝酸鉀(potassium nitrate；nitrite-free)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、澱粉(starch)、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、腸黏菌素(colistinmethane sulfonate)、拉他頭孢(sodium moxalactam)、氫氧化鉀、鋅粉、肌酸(creatine)、N,N,N',N'- 四 甲 基 對 - 苯 二 胺 鹽 酸 鹽 (N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、乳化劑(Tween 80)及甘油均採用化學試藥級。酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef exteact)、蛋白胨(peptone)、胨蛋白胨(proteose)、洋菜(agar)、胰化酪蛋白胨(tryptocase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胨蛋白胨 3 號(proteose

peptone No.3)、緩衝蛋白胨粉末(buffered peptone-water powder)、哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base)、血液基礎培養基(blood agar base)及去纖維之綿羊血(defibrinated sheep blood)均採用微生物級。

2.2.40. 試劑：

2.2.40.1. 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，溶於蒸餾水 80 mL。

將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

(2) 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水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達 300 mL。

(3) 哈克氏複染液(複染劑)

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

2.2.40.2. 3%過氧化氫溶液

取 30%過氧化氫溶液 5 mL，加入無菌蒸餾水 45 mL 中，冷藏備用。

2.2.40.3. 0.85 %無菌生理食鹽水(Physiological saline solution)

取氯化鈉 8.5 g，溶於蒸餾水 1000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.40.4. 0.5%吡啶黃素溶液(0.5% Acriflavin solution)

取吡啶黃素 0.5g，溶於蒸餾水 100 mL，過濾除菌，冷藏備用。

2.2.40.5. 0.5% 萘利啶酸鈉鹽溶液(0.5% Nalidixic acid solution)

取萘利啶酸鈉鹽 0.5 g，溶於蒸餾水 100 mL，過濾除菌，冷藏備用。

2.2.40.6. 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。

2.2.40.7. 含 1% 環己胺之 40% 乙醇溶液(1% Cycloheximide in 40% ethanol solution)

取環己胺 1 g，溶於無水乙醇:蒸餾水(2:3)溶液 100 mL，過濾除菌，冷藏備用。

2.2.40.8. 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite detection reagents)

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。

2.2.40.9. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)

取甲基紅 0.1 g，溶於 95% 乙醇 300 mL，再加入蒸餾水 200 mL，冷藏備用。

2.2.40.10. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagents, VP reagents)

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，溶於蒸餾水 100 mL，冷藏備用。

2.2.40.11. 氧化酶試劑(Oxidase reagent)

取 N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽 1g，溶於蒸餾水 100 mL，儲存於褐色瓶，置於冰箱中，使用期限以一週為宜。

2.2.40.12. 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液

取無水磷酸氫二鉀 17.4 g，溶於水 500 mL，調整 pH 值為 6.0，再加水至 1000 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘後，貯存於冰箱中備用。

2.2.40.13. 1% 腸黏菌素溶液 (Colistin solution)

取腸黏菌素 1 g，溶於 0.1 M 磷酸鉀緩衝溶液 100 mL，存於冰箱備用。

2.2.40.14. 拉他頭孢溶液(Moxalactam solution)

取拉他頭孢 1 g，溶於 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。

2.2.40.15. 5N 醋酸溶液

取冰醋酸 286 mL，以去離子水溶解使成 1000 mL。

2.2.40.16. 5%木糖溶液

稱取木糖 25 g，加蒸餾水溶解使成 500 mL，再以無菌濾膜過濾。

2.2.40.17. 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。

2.2.41. 培養基

2.2.41.1. 胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth, TSB)

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)	17 g
植物蛋白朊(phytone peptone)	3 g
氯化鈉	5 g
無水磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為

7.3±0.2。

- 2.2.41.2. 增菌培養液(Buffered listeria enrichment broth, BLEB)
- | | |
|---|---------|
| 胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)····· | 17 g |
| 植物蛋白朊(phytone peptone)····· | 3 g |
| 氯化鈉····· | 5 g |
| 磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)····· | 2.5 g |
| 葡萄糖(glucose)····· | 2.5 g |
| 酵母抽出物(yeast extract)····· | 6 g |
| 無水磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄ ；anhydrous)····· | 1.35 g |
| 無水磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄ ；anhydrous)····· | 9.6 g |
| 蒸餾水····· | 1000 mL |
- 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，混合均勻後分裝為每瓶 225 mL，最終 pH 值為 7.3±0.1。
- 2.2.41.3. 牛津培養基(Oxford medium, OXA)
- | | |
|---|---------|
| 哥倫比亞血液基礎培養基(Columbia blood agar base) 39~44 g (視廠牌而定) | |
| 粟糖苷(esculin)····· | 1 g |
| 檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)····· | 0.5 g |
| 氯化鋰(lithium chloride)····· | 15 g |
| 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 0.005g、頭孢泰坦 0.002g 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。
- 2.2.41.4. 帕爾康李斯特菌選擇性培養基(PALCAM Listeria selective agar, PALCAM)
- | | |
|-------------------|--------|
| 蛋白朊(peptone)····· | 11.5 g |
| 澱粉(starch)····· | 0.5 g |
| 氯化鈉····· | 2.5 g |

甘露糖醇(mannitol)	5 g
粟糖苷(esculin)	0.4 g
葡萄糖(glucose)	0.25 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.25 g
氯化鋰(lithium chloride)	7.5 g
酚紅(phenol red)	0.04 g
洋菜(agar)	6.5 g
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 7.0±0.1。

2.2.41.5. 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 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°C 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°C，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)。

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

胰化酪蛋白腴(trypticase peptone)	15 g
植物蛋白腴(phytone peptone)	5 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	15 g

蒸餾水 1000 mL
加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。

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

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone) 15 g
植物蛋白朊(phytone peptone)..... 5 g
氯化鈉 5 g
洋菜(agar) 15 g
酵母抽出物(yeast extract) 6 g
蒸餾水 1000 mL
加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。

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

牛肉抽出物(beef extract) 3 g
蛋白朊(peptone)..... 10 g
氯化鈉 5 g
洋菜(agar)..... 4 g
蒸餾水 1000 mL
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°C 滅菌 15 分鐘後，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.41.9. 綿羊血培養基(Sheep blood agar)

血液基礎培養基(blood agar base).....39~44 g (視廠牌而定)
蒸餾水 1000 mL
加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻至 45~46 °C，加入去纖維之綿羊血 50 mL，充分混勻後，分裝於培養皿中。

2.2.41.10. 硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract) ······ 3 g
蛋白胨(peptone) ······ 5 g
硝酸鉀(potassium nitrate ; nitrite-free) ······ 1 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 7.0±0.2。

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

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone) ······ 17 g
植物蛋白胨(phytone peptone) ······ 3 g
氯化鈉 ······ 5 g
磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) ······ 2.5 g
葡萄糖(glucose) ······ 2.5 g
酵母抽出物(yeast extract) ······ 6 g
蒸餾水 ······ 1000 mL
加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為
7.3±0.2。

2.2.41.12. MR-VP 培養液(MR-VP Broth)

緩衝蛋白胨粉末(buffered peptone-water powder) · 7 g
葡萄糖(glucose) ······ 5 g
磷酸氫二鉀(K₂HPO₄) ······ 5 g
蒸餾水 ······ 1000 mL
加熱溶解後，取 5 mL，注入於 10 × 100 mm 之試管內，
以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

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

胨蛋白胨 3 號(proteose peptone No.3) ······ 10 g
牛肉抽出物(beef extract) ······ 1 g
氯化鈉 ······ 5 g
溴甲酚紫(bromcresol purple) ······ 0.02 g

蒸餾水…………… 1000 mL

葡萄糖、粟糖苷、麥芽糖、甘露糖醇利用試驗用培養液：

分別取葡萄糖、粟糖苷、麥芽糖、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、木糖利用試驗用培養液：

分別取已過濾滅菌之 5% 鼠李糖、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%。

2.3. 檢液之調製^{(註1)(註2)}

2.3.1. 固態檢體：先適當切碎，混合均勻，取 25 g，加入增菌培養液 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，或將檢體置入無菌袋中，加入增菌培養液後，以鐵胃搓揉 2 分鐘。

2.3.2. 粉狀、粒狀或其它易於粉碎之檢體：混合均勻，取 25 g，加入增菌培養液 225 mL。

2.3.3. 液態檢體：搖勻，取 25 mL，加入增菌培養液 225 mL。

2.3.4. 凝態及濃稠液態檢體如布丁、煉乳：經適當攪拌均勻，取檢體 25 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

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°C 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. 若檢體總量不足 25 g (mL)，則添加作成 10 倍稀釋檢液所需之增菌液量。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 增菌培養：將 2.3. 節之檢液充分振搖，混合均勻，放入無菌容器內。於 30°C 培養 4 小時後，分別加入經過過濾除菌之 0.5% 吡啶黃素溶液 0.5 mL、0.5% 蔡利啶酸鈉鹽溶液 2 mL 及含 1%

環己胺之 40%乙醇溶液 1.25 mL，繼續增菌培養 44 小時後(若振盪培養，效果更佳)，供作檢液。

2.4.2. 分離培養

2.4.2.1. 選擇性培養基之選用：由 OXA 培養基、PALCAM 培養基及 MOX 培養基等含粟糖苷之選擇性培養基中擇一選用，建議同時必須選用 1 種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。

2.4.2.2. 使用無菌棉花棒沾取 2.4.1.節之增菌檢液，塗抹於選擇性培養基約 1/2 皿面積，再以接種環進行二區劃線(如圖一)。若使用 OXA 培養基、PALCAM 培養基及 MOX 培養基等選擇性培養基，檢液塗抹後於 35°C 培養 24~48 小時，典型李斯特菌菌落周邊呈黑色，部份生長較慢菌株，需再培養 24 小時，從中挑取 5 個以上具黑色沉澱之可疑菌落，接種於 TSAYE 培養基，30°C 培養 24~48 小時後，再另行接種於 TSBYE 培養液，30°C 培養 24~48 小時，以備進行生化特性測試；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，挑取典型菌落接種於 TSAYE 培養基及 TSBYE 培養液培養，以備進行生化鑑定。

2.4.3. 鑑定

2.4.3.1. 革蘭氏染色(Gram stain)

- (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，大小約為 $0.4\sim 0.5\ \mu\text{m} \times 1.0\sim 2.0\ \mu\text{m}$ ，無芽孢，呈單一或短鏈排列的短桿菌(short-rod)。

2.4.3.2. 觸酶試驗(Catalase test)：

自 TSAYE 培養基鈎菌，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。李斯特菌應為正反應。

2.4.3.3. 傘狀運動試驗(Umbrella motility test)：

自 TSAYE 培養基鈎菌，穿刺於 MTM 培養基中約 1/2 管深，於 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 培養 7 天，在培養基上緣下 3~5 mm 處出現傘狀(如圖二)即為正反應，否則為負反應。李斯特菌應為正反應。

2.4.3.4. β -溶血試驗(β -hemolysis test)：

自 TSAYE 培養基鈎菌接種於綿羊血培養基中，於 35°C 培養 48 小時，菌落形成後，現察溶血現象之有無，有溶血現象者為正反應，否則為負反應。李斯特菌具微弱溶血現象，應為正反應。

2.4.3.5. 醣類利用試驗(Carbohydrate utilization test)：

自 TSBYE 培養液鈎菌，接種於分別含 0.5%鼠李糖、木糖、甘露糖醇。葡萄糖、麥芽糖、或粟糖苷之紫色碳水化合物培養液，於 35°C 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

甘正反應；木糖及甘露糖醇應為負反應。

2.4.3.6. 歐普氏試檢(VP test)：

自 TSAYE 培養基鈎菌接種於 MR-VP 培養液中，於 35°C 培養 48±2 小時後，取培養菌液 1 mL 至另一滅菌試管中，加入歐普氏試劑之溶液 A 0.06 mL 及溶液 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。李斯特菌應為正反應。

2.4.3.7. 甲基紅試驗(MR test)：將 2.4.3.6. 節剩餘之 MR-VP 培養液，於 35°C 再培養 48±2 小時後，加入甲基紅指示劑 0.3 mL，輕輕搖勻，培養液呈紅色者為正反應，呈黃色者為負反應。李斯特菌應為正反應。

2.4.3.8. 氧化酶試驗(Oxidase test)：

自 TSAYE 培養基鈎菌，塗抹於滴有氧化酶試劑之試紙上，10~15 秒後變為深藍色者為正反應，否則為負反應。李斯特菌應為負反應。

2.4.3.9. CAMP 試驗(CAMP test)：

將 *R. equi* 及 *S. aureus* 接種於 TSAYE 培養基上，於 35°C 培養 24 小時後，以 0.85% 無菌生理食鹽水配製成大於 1.0 McFarland 濃度之菌液，再以無菌棉花棒平行接種於綿羊血培養基上，二者之間亦用無菌棉花棒接種濃度為 2.0 McFarland 之可疑菌株菌液及李斯特菌標準菌株菌液，接種時不交互重疊，須距 *R. equi* 及 *S. aureus* 各 2~3 mm (如圖三)，於 35°C 培養 18~24 小時後觀察結果。靠近 *S. aureus* 處溶血較多，近 *R. equi* 處溶血不明顯者為正反應，否則為負反應。李斯特菌應為正反應。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。

2.4.3.10. 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)：

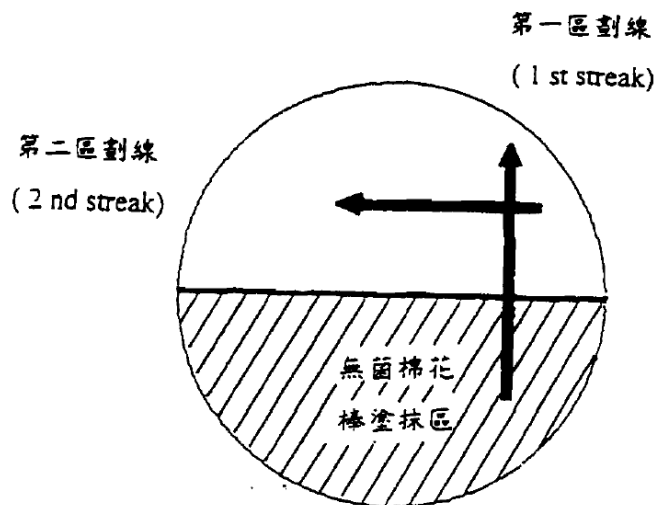
自 TSBYE 培養液鈎菌接種於硝酸鹽培養液中，於 35°C 培養 5 天後，依序加入亞硝酸鹽試驗試劑之溶液 A 及溶液 B 各 0.2 mL，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色者為正反應，若顏色無變化時加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時，則為負反應。李斯特菌應為負反應。

2.4.3.11. 菌種保存

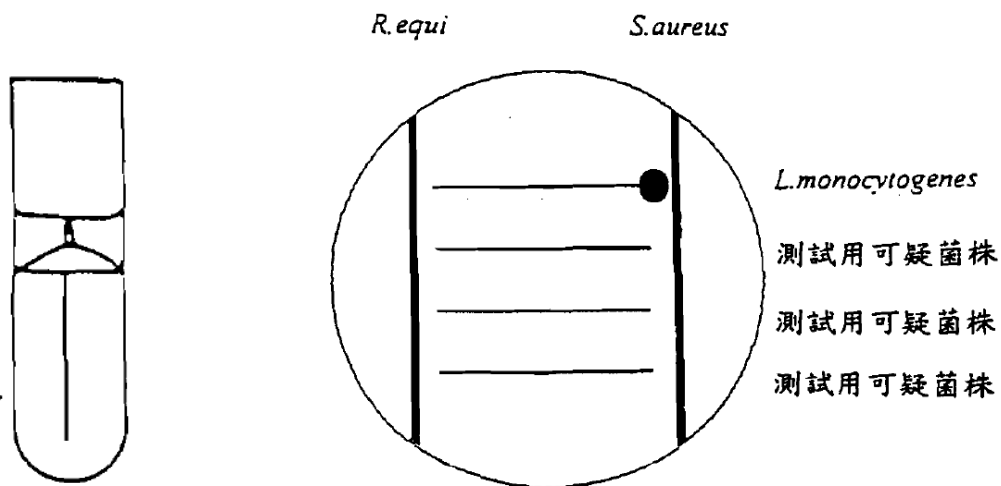
若要長期保存，則取 TSB 培養液培養 6~12 小時之菌液 1 mL，加入經 121°C 滅菌 15 分鐘之甘油 0.1 mL 至無菌冷凍試管，以液態氮冷凍或立刻置入-70°C 冷凍櫃保存。

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. 生長於含粟糖苷之 選擇性培養基之 典型菌落外觀特徵	菌落周邊產生黑色沉澱	菌落周邊 無黑色沉澱 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. 硝酸鹽還原試驗	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. 粟糖苷利用試驗	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	+



圖一、OXA、MOX 及 PALCAM 培養基之塗佈畫線法



圖二、傘狀運動之典型陽性反應

圖三、CAMP 試驗菌株排列方式

第二部：單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於單核球增多性李斯特菌之鑑別。
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)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 × 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. 水浴裝置：溫差±1°C 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. *Listeria monocytogenes*(標的基因：*iap* gene)

引子 F：Lm835F

5'- AACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTA-3'

引子 R：Lm998R

5'- TAGGCGCAGGTGTAGTTGCT-3'

探針 P：Lm918P

5'-FAM-CTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGC
-BHQ-3'

PCR 增幅產物大小 163 bp

2.3.2.1.2. *Listeria* spp.(標的基因：*iap* gene)

引子 F：Lall1055F

5'- GTTAAAAGCGGTGACACTATTTGG-3'

引子 R：Lall1163R

5'-TTTGACCTACATAAATAGAAGAAGAAGATAA-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°C 貯存備用，另探針需避光保存，*Listeria monocytogenes* 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；*Listeria* 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 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。

2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μ L。

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

5 μ M 引子 F 2.0 μ L

5 μ M 引子 R..... 2.0 μ L

5 μ M 探針..... 1.0 μ L

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit..... 12.5 μ L

檢體 DNA 溶液..... 5.0 μ L

無菌去離子水 2.5 μ L

總體積..... 25.0 μ L

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 \times 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 \times 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°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，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		

<i>Listeria monocytogenes</i>	60°C	30 sec
<i>Listeria spp.</i>	60°C	30 sec

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 *Listeria monocytogenes* 及 *Listeria spp.* 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 *Listeria monocytogenes*。

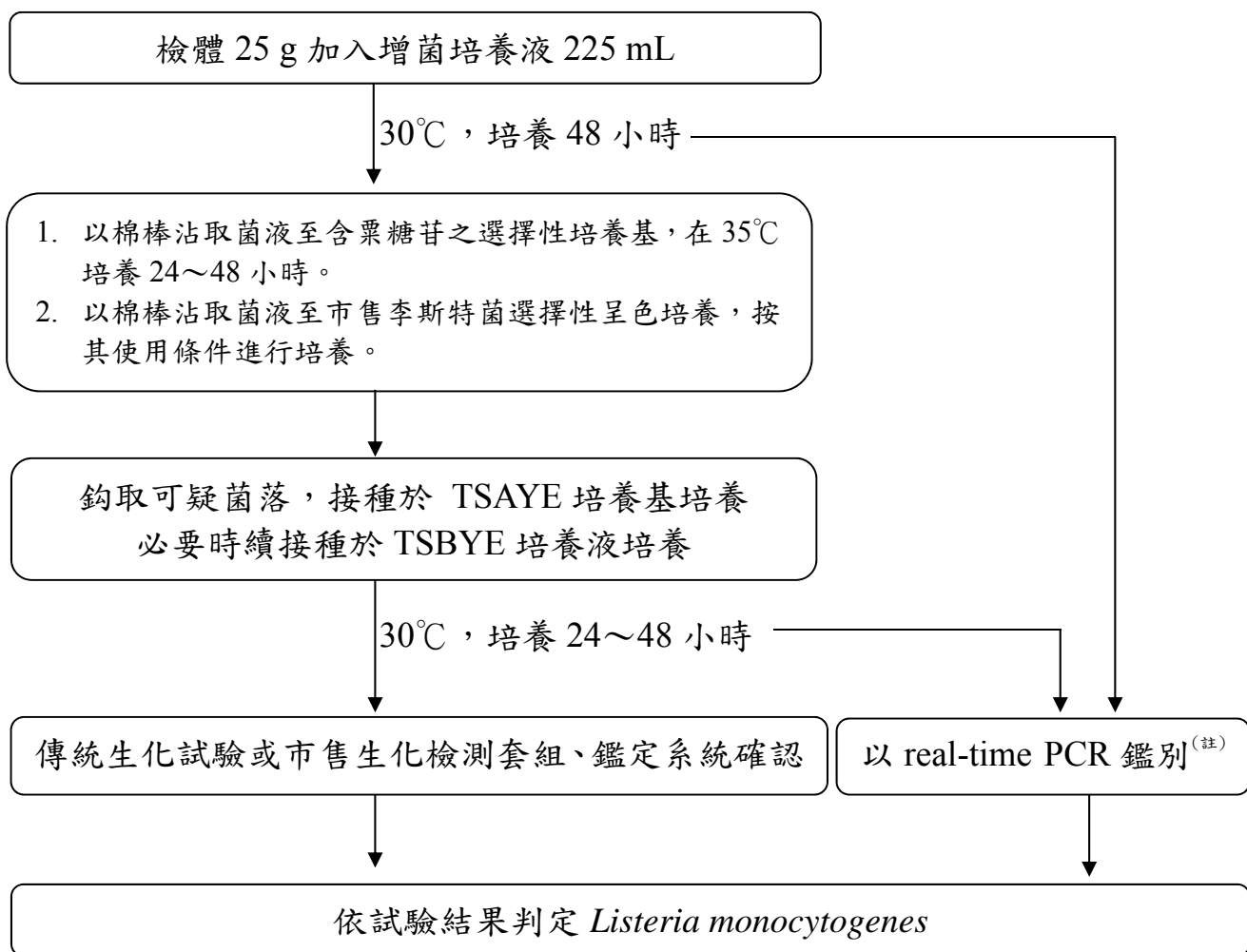
註 5：本 real-time PCR 反應條件係採 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢測可視需要執行。

參考文獻：

1. FDA's Bacteriological Analytical Manual: *Listeria monocytogenes*
2. Restaino, L., E. W. Frampton, R. M. Irbe, G. Schabert, and H. Spitz. 1999. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Food Protect.* 62:244-251.
3. 曾思堯，王鈺婷，黃翠萍，林旭陽，闕麗卿，施養志。2012。食品中李斯特菌 Real-time PCR 檢驗方法開發。行政院衛生署食品藥物管理局 101 年度研究計畫(DOH101-FDA-72031)。

檢驗流程圖



註：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。