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修正草案總說明

為加強食品微生物之管理，依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「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」修正草案，其修正要點如下：

一、第一部修正「器具及材料」、「試藥」、「試劑」、「培養基」、「檢液之調製」、「鑑別試驗」及「最確數之測定」，其中「檢液之調製」增列「系列稀釋」，「鑑別試驗」增列「最確數計數法」及「直接平板法」。

二、第二部修正「裝置」、「試藥」、「器具及材料」及「檢體 DNA 溶液之製備」。

三、增列參考文獻。

四、修正檢驗流程圖。

五、增修訂部分文字。

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修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
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：檢體經前處理並系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數，或以三階三支進行培養配合MPN計數，或增菌培養後進行定性分析。 2.1. 工作環境：工作平檯須寬敞、潔淨、光線良好，操作平檯光度為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：能維持內部溫度在170 ± 10℃者。 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達121℃以上者。 2.2.4. 冰箱：能維持5 ± 3℃者。 2.2.5. 冷凍櫃：能維持-20 ± 3℃者。 2.2.6. 超低溫冷凍櫃：能維持-70 ± 5℃者。 2.2.7. 水浴：維持水溫溫差在± 1.0℃以內者。 2.2.8. 培養箱：維持內部溫差± 1.0℃以內者。 2.2.9. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。 2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。 2.2.11. 天平：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。 2.2.12. 酸鹼度測定儀。 2.2.13. 旋渦混合器。 2.2.14. 加熱器。 2.2.15. 攪拌器。	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：工作平檯須寬敞、潔淨、光線良好，操作平檯光度為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 ± 3℃者。 2.2.5. 冷凍櫃：保持-30 ± 3℃者。 2.2.6. 超低溫冷凍櫃：保持-70 ± 5℃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±1.0℃以內者。 2.2.12. 水浴：維持水溫溫差在±1.0℃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。	一、第一部修正「器具及材料」、「試藥」、「試劑」、「培養基」、「檢液之調製」、「鑑別試驗」及「最確數之測定」，其中「檢液之調製」增列「系列稀釋」，「鑑別試驗」增列「最確數計數法」及「直接平板法」。 二、第二部修正「裝置」、「試藥」、「器具及材料」及「檢體DNA溶液之製備」。 三、增列參考文獻。 四、修正檢驗流程圖。 五、增修訂部分文字。

2.2.16. 振盪器。 2.2.17. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。 2.2.18. 光源：一般日光燈。 2.2.19. 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。 2.2.20. 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。 2.2.21. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm試管或其他合適者。 2.2.22. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑銥或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.23. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子、研缽及杵：可滅菌或可拋棄式者。 2.2.24. 無菌濾膜：孔徑0.22 μm或以下之親水性醋酸纖維膜。 2.2.25. 酸鹼度測定試紙：pH值範圍為6～8。 2.2.26. 濾紙。 2.2.27. 載玻片及蓋玻片：用於染色及鏡檢用。 2.2.28. 無菌棉花棒。 2.2.29. 吸管輔助器。 2.2.30. 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。 2.2.31. 微量吸管：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.2.32. 吸管尖：已滅菌，10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。 2.2.33. 塗抹曲棒：直徑3～4 mm，塗抹區域45～55 mm，可滅菌或可拋棄式者。 2.2.34. 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。 2.2.35. 蠟筆或麥克筆：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* (ATCC 49444; BCRC 14980)，	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，鉑銥或鉻線材質，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)。	

Rhodococcus equi (ATCC_6939; BCRC_12859)， *Listeria monocytogenes* (ATCC_19111; BCRC_14845)。 2.2.39. 試藥： 磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、丙酮酸鈉鹽(sodium pyruvate)、栗糖苷(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)、吖啶黃素(acriflavin-HCl)、頭孢泰坦(cefotean)、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 (KNO_3；nitrite-free)、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、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、冰醋酸、萘基乙二胺鹽酸鹽([*N*-(1-naphthyl) ethyl enediamine dihydrochloride])、甲基紅(methyl red)、α-萘酚(α-naphthol)、無水乙醇、腸黏菌素(colistin methanesulfonate)、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)、聚山梨醇酯80 (polysorbate 80, 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 extract)、蛋白胨(peptone)、月示蛋白胨(proteose)、洋菜(agar)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、月示蛋白胨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	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)、栗糖苷(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)、吖啶黃素(acriflavin-HCl)、頭孢泰坦(cefotean)、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(bromcresol 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) ethy1enediamine 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)、月示蛋白胨(proteose)、洋菜(agar)、胰化酪蛋白胨(tryptocase peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、月示蛋白胨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。	

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)(註1) (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，於研缽研磨5～10秒，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水l0 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水，將此溶液注入褐色瓶，再以適量蒸餾水洗滌研缽及杵後，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，加蒸餾水90 mL，作為複染液。 註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此購買成品時，要注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。 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，避光冷藏備用。 2.2.40.3. 0.85%生理食鹽水 (Physiological saline solution) 取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121℃滅菌15分鐘。 2.2.40.4. 0.5%吖啶黃素溶液(0.5% Acriflavin solution) 取吖啶黃素0.5 g，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. 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，置於研缽中，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l0 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缽及杵後，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 (Physiologica1 saline solution) 取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121℃滅菌15分鐘。 2.2.40.4. 0.5%吖啶黃素溶液(0.5% Acriflavin solution) 取吖啶黃素0.5 g，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	

2.2.40.7. 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：取對-胺基苯磺酸1 g，溶於5 N醋酸溶液125 mL，冷藏備用。 溶液B：取萘基乙二胺鹽酸鹽0.25 g，溶於5 N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1 g，溶於蒸餾水100 mL，儲存於褐色瓶，冷藏備用，使用期限以一週為宜。 2.2.40.12. 0.1 M磷酸鉀緩衝液 取磷酸氫二鉀17.4 g，溶於蒸餾水500 mL，調整pH值為6.0±0.1，再加蒸餾水至1000 mL，經121℃滅菌15分鐘，冷藏備用。 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磷酸鉀緩衝液100 mL，冷藏備用。 2.2.40.14. 拉他頭孢溶液(Moxalactam solution) 取拉他頭孢1 g，溶於0.1 M磷酸鉀緩衝液100 mL，過濾除菌，分取2 mL，注入試管內，冷藏備用。 2.2.40.15. 5 N醋酸溶液 取冰醋酸286 mL，以蒸餾水溶解使成1000 mL。 2.2.40.16. 5%木糖溶液 取木糖25 g，加蒸餾水溶解使成500 mL，再以無菌濾膜過濾。	(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5 N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5 N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1 g，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℃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. 5 N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。	

2.2.40.17. 5%鼠李糖溶液

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)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃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)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
氯化鈉	5 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 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	1.35 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	9.6 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，使用前再加入經過濾除菌之10%丙酮酸鈉鹽溶液11.1 mL，混合均勻，最終pH值為7.3 ± 0.1。

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)	33～44 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℃滅菌15分鐘，冷卻至50℃，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、吖啶黃

2.2.41. 培養基

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

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
氯化鈉	5 g
無水磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃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)

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
氯化鈉	5 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 g
無水磷酸二氫鉀(KH_2PO_4；anhydrous)	1.35 g
無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4；anhydrous)	9.6 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，使用前再加入經過濾除菌之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℃滅菌15分鐘，冷卻至50℃，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、吖啶黃素0.005 g、頭孢泰坦0.002 g及弗斯弗黴

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。

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

蛋白胨(peptone)	11.5 g
澱粉(starch)	0.5 g
氯化鈉	2.5 g
甘露糖醇(mannitol)	5 g
栗糖苷(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℃滅菌15分鐘，冷卻至50℃，加入經過濾除菌之含多黏桿菌素B硫酸鹽0.005 g、吖啶黃素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。

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)	33～44 g (視廠牌而定)
洋菜(agar)	2 g
栗糖苷(esculin)	1 g
檸檬酸鐵銨 (ferric ammonium citrate)	0.5 g
氯化鋰(lithium chloride)	15 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 ± 0.1，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)。

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

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)

蛋白胨(peptone)	11.5 g
澱粉(starch)	0.5 g
氯化鈉	2.5 g
甘露糖醇(mannitol)	5 g
栗糖苷(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℃滅菌15分鐘，冷卻至50℃，加入經過濾除菌之含多黏桿菌素B硫酸鹽0.005 g、吖啶黃素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
栗糖苷(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℃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)。

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

胰化酪蛋白胨 (trypticase	15 g

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

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15 g
植物蛋白胨(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℃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
蛋白胨(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℃滅菌15分鐘，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)	33～44 g (視廠牌而定)
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，冷卻至45～46℃，加入去纖維之綿羊血50 mL，充分混勻後，分裝於培養皿。

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(KNO_3；nitrite-free)	1 g
蒸餾水	1000 mL

peptone)	
植物蛋白胨(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℃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(Trypicase soy agar with 0.6% yeast extract, TSAYE)

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

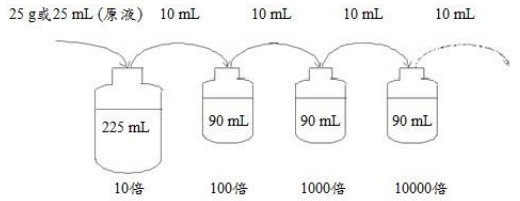
血液基礎培養基(blood agar base)	39～44 g (視廠牌而定)
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，冷卻至45～46℃，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

<table>
<tr>
<td>
加熱溶解後，分取5 mL，注入試管內，以121℃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(Trypticase soy broth with 0.6% yeast extract, TSBYE)
<table>
<tr><td>胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)</td><td>17 g</td></tr>
<tr><td>植物蛋白胨(phytone peptone)</td><td>3 g</td></tr>
<tr><td>氯化鈉</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)</td><td>2.5 g</td></tr>
<tr><td>葡萄糖(glucose)</td><td>2.5 g</td></tr>
<tr><td>酵母抽出物(yeast extract)</td><td>6 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
加熱溶解後，以121℃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)
<table>
<tr><td>緩衝蛋白胨粉末(buffered peptone-water powder)</td><td>7 g</td></tr>
<tr><td>葡萄糖(glucose)</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
加熱溶解後，取5 mL，注入於10 × 100 mm之試管內，以121℃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)
<table>
<tr><td>月示蛋白胨3號(proteose peptone No.3)</td><td>10 g</td></tr>
<tr><td>牛肉抽出物(beef extract)</td><td>1 g</td></tr>
<tr><td>氯化鈉</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>溴甲酚紫(bromocresol purple)</td><td>0.02 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
葡萄糖、蜜糖苷、麥芽糖、甘露糖醇利用試驗用培養液：
分別取葡萄糖、蜜糖苷、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℃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
</td>
<td>
加熱溶解後，分取5 mL，注入試管內，以121℃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)
<table>
<tr><td>胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)</td><td>17 g</td></tr>
<tr><td>植物蛋白胨(phytone peptone)</td><td>3 g</td></tr>
<tr><td>氯化鈉</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)</td><td>2.5 g</td></tr>
<tr><td>葡萄糖(glucose)</td><td>2.5 g</td></tr>
<tr><td>酵母抽出物(yeast extract)</td><td>6 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
加熱溶解後，以121℃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)
<table>
<tr><td>緩衝蛋白胨粉末(buffered peptone-water powder)</td><td>7 g</td></tr>
<tr><td>葡萄糖(glucose)</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
加熱溶解後，取5 mL，注入於10 × 100 mm之試管內，以121℃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)
<table>
<tr><td>月示蛋白胨3號(proteose peptone No.3)</td><td>10 g</td></tr>
<tr><td>牛肉抽出物(beef extract)</td><td>1 g</td></tr>
<tr><td>氯化鈉</td><td>5 g</td></tr>
<tr><td>溴甲酚紫(bromcresol purple)</td><td>0.02 g</td></tr>
<tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr>
</table>
葡萄糖、蜜糖苷、麥芽糖、甘露糖醇利用試驗用培養液：
分別取葡萄糖、蜜糖苷、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℃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、木醣糖溶液加入已滅菌、分裝之紫色碳水化
</td>
<td></td>
</tr>
</table>

物培養液，使其最終濃度為0.5%。 2.3. 檢液之調製(註2-3) 2.3.1. 固態檢體:檢體切碎混合均勻後，取25 g，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。 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:將檢體振搖均勻混合，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、煉乳等，攪拌均勻，取25 g，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。 2.3.5. 冷凍檢體:須解凍者，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(45℃以下之水浴，可於15分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。俟檢體解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依2.3.1.節，製成10倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於-20℃。 2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之10倍稀釋檢液10 mL，加至稀釋液90 mL，依序作成一系列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。  2.3.7. 塗抹物(Swab)檢體:將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加增菌培養液5 mL，將試管蓋旋緊，於10秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達15公分) 50次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，取溶出液供作檢液。 註2：處理含油脂量多，不易勻散及易	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℃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℃培養4小時後，分別加入經過濾除菌之0.5%吖啶黃素溶液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	

起泡沫之檢體，加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。 註3：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. 分離培養 2.4.1.1. 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℃培養4小時，分別加入經過濾除菌之0.5 %吖啶黃素溶液0.5 mL、0.5 %萘利啶酸鈉鹽溶液2.5 mL及含1%環己胺之40%乙醇溶液1 mL，繼續增菌培養44小時(若振盪培養，效果更佳)，接續2.4.2.節，以棉棒沾取增菌液塗抹於選擇性培養基，倒置於35℃培養24～48時。 2.4.1.2. 最確數(Most Probable Number，簡稱MPN)計數法 2.4.1.2.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，進行連續稀釋兩次。 2.4.1.2.2. 分別吸取1 mL檢液及(或)原液，接種於9 mL增菌培養液中，各接種三支(稱三階三支)，並於30 ℃培養4小時後，分別加入經過濾除菌之0.5%吖啶黃素溶液20 μL、0.5%萘利啶酸鈉鹽溶液100 μL及含1%環己胺之40%乙醇溶液40 μL，繼續增菌培養44小時 (若振盪培養，效果更佳)，接續2.4.2.節，以棉棒沾取增菌液塗抹於選擇性培養基，於35℃培養24～48小時。 2.4.1.3. 直接平板法(Direct plate count method) 2.4.1.3.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，進行連續稀釋。 2.4.1.3.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液1 mL，置入3個選擇性培養基(例如：0.3 mL、0.3 mL及0.4 mL)，每一檢液至少做二重複，共6個平板。 2.4.1.3.3. 以已滅菌塗抹曲棒均勻塗抹乾後，於35℃培養24～48小時，觀察所形成菌落之生長狀態。 2.4.1.3.4. 選取含25～250個菌落之平板，接續2.4.2.3.節。 2.4.2. 選擇性培養基	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℃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℃培養24～48小時後，再另行接種於TSBYE培養液，30℃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0.4～0.5 μm × 1.0～2.0 μm，無芽抱，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 moti1ity test)：	

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2.4.1.1.及2.4.1.2.2.節之檢液，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℃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。 2.4.2.3. 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℃培養24～48小時，再另行接種於TSBYE培養液，30℃培養24～48小時，以備進行生化鑑定；若使用市售李斯特菌選擇性呈色培養基，則按其使用說明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) 加適量0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速通過火焰3～4次微熱固定，勿直接火烤。 (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘，水洗。 (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘，水洗。 (4) 脫色：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水洗，此步驟僅約30秒，惟視抹片之厚薄而定。 (5) 複染：用哈克氏複染液複染30秒，水洗。 (6) 風乾。	自TSAYE培養基鉤菌，穿刺於MTM培養基中約1/2管深，於20～25℃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-hemo1ysis test)： 自TSAYE培養基鉤菌接種於綿羊血培養基中，於35℃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培養液鉤菌，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℃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、粟糖苷正反應；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培養基鉤菌接種於MR-VP培養液中，於35℃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℃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培養基鉤菌，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℃培養24小時後，以0.85%	

(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，不產芽孢。 2.4.3.2. 觸酶試驗(Catalase test)： 自TSAYE培養基鉤菌，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培養基鉤菌，穿刺於MTM培養基中約1/2管深，於20～25℃培養，每隔24小時觀察一次，至多觀察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培養基鉤菌接種於綿羊血培養基中，於35℃培養48小時，菌落形成後，觀察溶血現象之有無，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培養液鉤菌，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℃培養，每隔24小時觀察一次，至多觀察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、粟糖苷正反應；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培養基鉤菌接種於MR-VP培養液中，於35℃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 0.6 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)：	無菌生理食鹽水配製成大於1.0 McFar1and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℃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培養液鉤菌接種於硝酸鹽培養液中，於35℃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℃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：	

將2.4.3.6.節剩餘之MR-VP培養液，於35℃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培養基鉤取少量新鮮菌落(避免使用鎳鉻製品)，塗抹於含有氧化酶試劑濕潤試紙上，10秒內變為深藍紫色者為正反應，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℃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℃培養24～48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)：

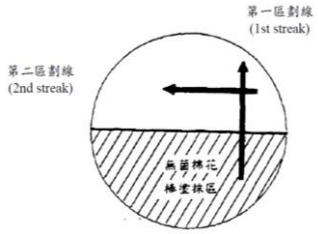
自TSBYE培養液鉤菌接種於硝酸鹽培養液中，於35℃培養5天後，依序加入亞硝酸鹽試驗試劑之溶液A及溶液B各0.2 mL，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色者為正反應，若顏色無變化時加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時，則為負反應。李斯特菌應為負反應。

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℃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℃超低溫冷凍櫃保存。

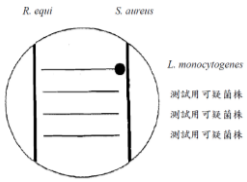
2.5. 判定：單核球增多性李斯特菌陽性

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. 生長於含果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 *S. aureus* 相接處具溶血現象，與 *R. equi* 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.果糖苷利用試驗	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

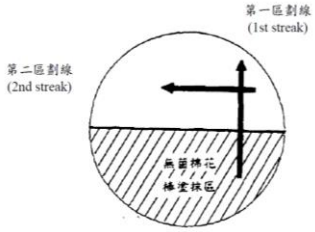
1. 適用範圍：本方法適用於單核球增多性李斯特菌之鑑別。

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、

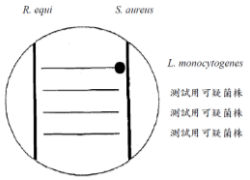
者，應符合下表所列之結果

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. 生長於含果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 *S. aureus* 相接處具溶血現象，與 *R. equi* 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.果糖苷利用試驗	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

2.6. 計數

2.6.1.最確數計算：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

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℃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℃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

正反應試管數			MPN/mL (g)	95%信賴界限		正反應試管數			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	--

*：各階試管中所含檢體量(g或mL)

說明：最確數表適用的接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

最確數MPN/g (MPN/mL) = $\frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量}\times 10}$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為3-1-0時，對照最確數表之最確數為43，

(1) 當接種量為各階試管含檢體1, 0.1, 0.01, (g或mL)，推算出測試菌之最確數 $= \frac{43}{1\times 10} = 4.3$ MPN/g (MPN/mL)。

(2) 當接種量為各階試管含檢體0.1, 0.01, 0.001 (g或mL)，推算出測試菌之最確數 $= \frac{43}{0.1\times 10} = 43$ MPN/g (MPN/mL)。

(3) 當接種量為各階試管含檢體0.01, 0.001, 0.0001 (g或mL)，推算出測試菌之最確數 $= \frac{43}{0.01\times 10} = 4.3\times 10^2$ MPN/g (MPN/mL)。

2.6.2. 直接平板法菌數之計算

2.6.2.1. 計算出可疑菌落中含有單核球增多性李斯特菌之比率(R，見下公式)，再以2.6.2.2.或2.6.2.3.節公式計算出檢體中單核球增多性李斯特菌數。

比率(R) = $\frac{N_1}{N_0}$

N_0：進行試驗之可疑菌落數

N_1：經試驗後判定為單核球增多性李斯特菌之菌落數

2.6.2.2. 各稀釋倍數中僅有一稀釋倍數平板之菌落數為25～250時，應計數該

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℃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 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。

稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和並依下列公式計算。紀錄菌數時應將第三位數字四捨六入(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)，使其有效數為兩位。菌數之表示方式為CFU/g或CFU/mL。

單核球增多性李斯特菌數(CFU/g或CFU/mL) = $(\sum a) \times \frac{A}{V_A} \times R$

Σa：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數之總和

V_A：A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A：稀釋倍數

R：比率

2.6.2.3. 當有兩種稀釋倍數平板之菌落數在25～250時，先個別計算出各稀釋倍數之單核球增多性李斯特菌數，再取其平均值，依下列公式計算。

單核球增多性李斯特菌數(CFU/g或CFU/mL)

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

Σa：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

Σb：B稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

V_A： A稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

V_B： B稀釋倍數之所有平板中檢液總體積

A、B：稀釋倍數

R：比率

2.7. 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，以本檢驗方法為準。

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。

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：檢體之增菌液或分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合

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

註4：Real-time PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之DNA溶液製備

自第一部2.4.1.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

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：可達121℃以上者。

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：可達20000 ×g，並具4℃溫控功能。

2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。

2.2.7. 冰箱：能維持5 ± 3℃者。

2.2.8. 冷凍櫃：能維持-20 ± 3℃者。

2.2.9. 旋渦混合器。

2.2.10. 酸鹼度測定儀。

2.2.11. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。

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'

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℃	20 sec
2.變性	95℃	5 sec
3.黏接		
Listeria monocytogenes	60℃	30 sec
Listeria spp.	60℃	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

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℃冷凍保存，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參考菌株或其DNA。 2.4. 器具及材料(註3) 2.4.1. 微量吸管：2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL及1000 μL。 2.4.2. 吸管尖：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	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。	

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

註4：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

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，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸10分鐘，取出離心管，作為檢體DNA原液，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，於-20℃冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自培養基上鉤取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管，振盪混合均勻，煮沸10分鐘，取出離心管，待冷卻後以15000 ×g離心3分鐘，吸取上清液至另一已滅菌1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，於-20℃冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行

檢體DNA原液之製備。

2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷

取適量之檢體DNA原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定260 nm及280 nm之吸光值(O.D.)。以波長260 nm吸光值乘50 ng/μL及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以$O.D._{260}/O.D._{280}$比值作判斷，其比值應介於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，各別加入檢體DNA溶液5 μL，再將real-time PCR反應盤置於離心機，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 (°C)	時間 (sec)
1.熱活化	95	20
2.變性	95	5
3.黏接		
Listeria monocytogenes	60	30
Listeria spp.	60	30
步驟2至步驟3，共進行45個循環反應。		

2.7.2. Real-time PCR螢光分析

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

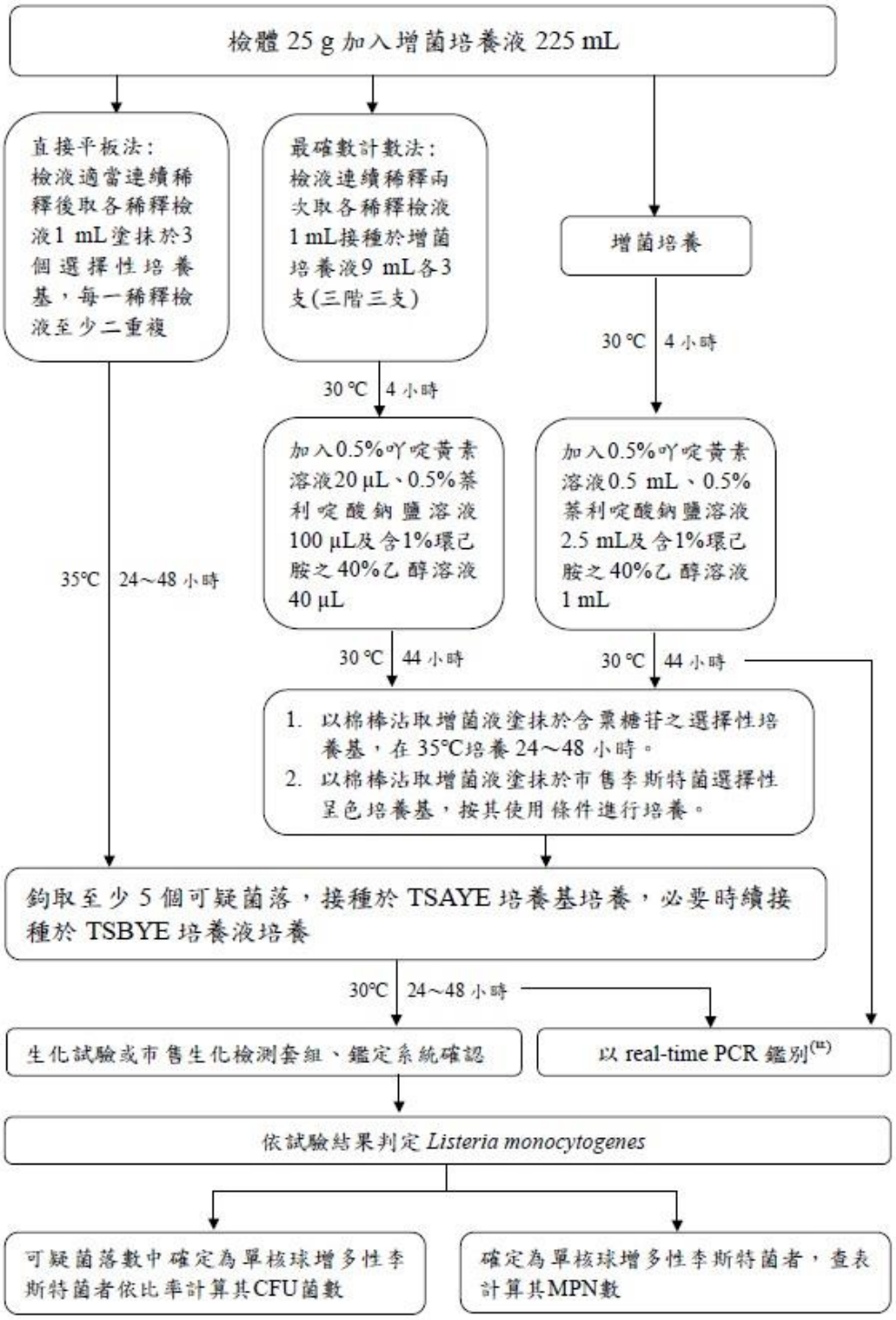
2.7.3. 確認

檢體DNA之real-time PCR增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體DNA與*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檢驗可視需要執行。 參考文獻： 1. United States Department of Agriculture. 2019. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat Siluriformes (fish) and egg products and environmental samples. Microbiology Laboratory Guidebook 8.11. [https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES] 2. Hitchins, A. D., Jinneman, K. and Chen, Y. 2017. Chapter 10 Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Bacteriological Analytical Manual. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes]		

修正規定

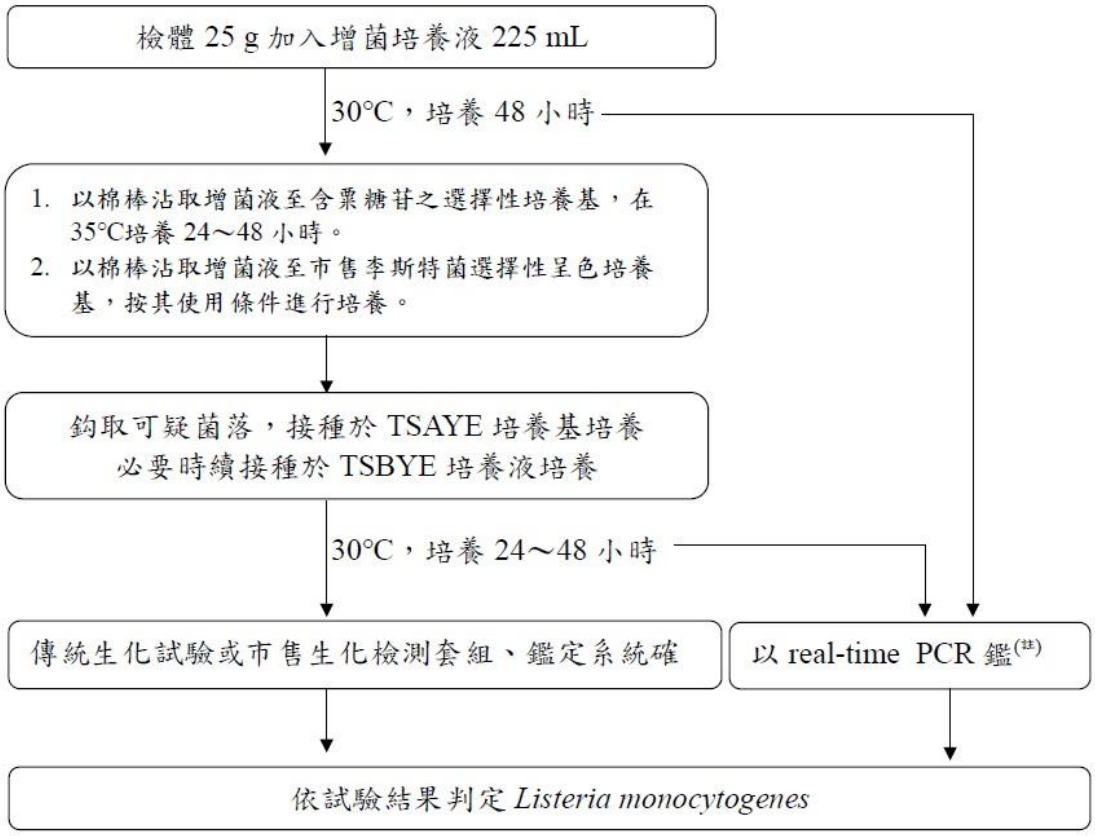
<u>檢驗流程圖</u>



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。

現行規定

<u>檢驗流程圖</u>



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。