

食品微生物之檢驗方法－食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 Foods

第一部：單核球增多性李斯特菌之分離與鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中單核球增多性李斯特菌之檢驗。
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，或增菌培養後進行定性分析。
  - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為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 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達 $121^{\circ}\text{C}$ 以上者。
    - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.5. 冷凍櫃：能維持 $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.6. 超低溫冷凍櫃：能維持 $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.7. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.8. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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. 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g者，靈敏度為1 mg。
    - 2.2.11. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
    - 2.2.12. 酸鹼度測定儀。
    - 2.2.13. 旋渦混合器。
    - 2.2.14. 離心機。
    - 2.2.15. 加熱器。
    - 2.2.16. 攪拌器。
    - 2.2.17. 振盪器。
    - 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. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。
- 2.2.21. 試管：13 × 100 mm、16 × 150 mm試管或其他適用者。
- 2.2.22. 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。
- 2.2.23. 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。
- 2.2.24. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。
- 2.2.25. 酸鹼度測定試紙：pH值範圍為6~8。
- 2.2.26. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子、研鉢及杵：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.27. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.28. 無菌棉花棒。
- 2.2.29. 吸管輔助器或微量吸管。
- 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之刻度。
- 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. 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。
- 2.2.34. 濾紙。
- 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 pseudintermedius* (ATCC 49444; BCRC 14980)，  
*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; BCRC 10781)，  
*Rhodococcus equi* (ATCC 6939; BCRC 12859)，  
*Listeria monocytogenes* (ATCC 19111; BCRC 14845、ATCC 19115; BCRC 15352)。
- 2.2.39. 試藥：  
磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、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 (KNO<sub>3</sub>; 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-氨基苯磺酸 (sulfanilic acid)、冰醋酸、萘基乙二胺鹽酸鹽 ([N-(1-naphthyl) ethyl enediamine dihydrochloride])、甲基紅 (methyl red)、 $\alpha$ -萘酚 ( $\alpha$ -naphthol)、無水乙醇、腸黏菌素 (colistin methane 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)、聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80, Tween 80) 及甘油均採用試藥級。酵母抽出物 (yeast extract)、牛肉抽出物 (beef extract)、蛋白胨 (peptone)、洋菜 (agar)、胰化酪蛋白胨 (trypticase 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)<sup>(註1)</sup>

###### (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 於研鉢研磨 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 10

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鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達300 mL。

(3) 哈克氏(Hucker's)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，加入蒸餾水90 mL，作為複染液。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，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°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0.5 g，溶於蒸餾水100 mL，過濾除菌，避光冷藏備用。

2.2.40.5. 0.5%萘利啶酸鈉鹽溶液(0.5% Nalidixic acid (sodium salt) 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, v/v)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，再加蒸餾水使成500 mL。

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

溶液A：取 $\alpha$ -萘酚5 g，溶於無水乙醇100 mL。

溶液B：取氫氧化鉀40 g，溶於蒸餾水使成100 mL

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 $6.0 \pm 0.1$ ，再加蒸餾水至1000 mL，以 $121^\circ\text{C}$ 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，分裝2 mL冷藏備用。

2.2.40.15. 5 N醋酸溶液

取冰醋酸286 mL，加蒸餾水使成1000 mL。

2.2.40.16. 5%鼠李糖溶液

取鼠李糖25 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。

2.2.40.17. 5%木糖溶液

取木糖25 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。

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
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	2.5 g
葡萄糖(glucose) .....	2.5 g
蒸餾水.....	1000 mL

加熱溶解後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.3 \pm 0.2$ 。

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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)..... 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)..... 1.35 g  
 磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ..... 9.6 g  
 蒸餾水..... 1000 mL  
 加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，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) ..... 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，加入經過濾除菌之含環己胺0.4 g、大腸菌素硫酸鹽0.02 g、吡啶黃素0.005 g、頭孢泰坦0.002 g及弗斯弗黴素0.01 g之無水乙醇/蒸餾水(1:1, v/v)溶液10 mL，充分混勻後，分裝於培養皿。

#### 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，充分混勻後，分裝於培養皿，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) ..... 39~44 g(視廠牌而定)

洋菜(agar) ..... 2 g

粟糖苷(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 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 ± 0.1，並用恆溫水浴方式，迅速冷卻至46°C，同時加入經過過濾除菌之拉他頭孢溶液2 mL，充分混勻後，分裝於培養皿(本培養基勿需再添加任何補充劑)。

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

胰化酪蛋白腴(trypticase peptone) ..... 17 g

植物蛋白腴(phytone peptone)..... 3 g

氯化鈉..... 5 g

磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)..... 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。

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

胰化酪蛋白腴(trypticase peptone) ..... 15 g

植物蛋白腴(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  
加熱溶解後，分取5 mL注入試管內，以121°C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°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。

2.2.41.10. 硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract) ..... 3 g  
蛋白朊(peptone)..... 5 g  
硝酸鉀(KNO<sub>3</sub>; 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. MR-VP培養液(MR-VP broth)

緩衝蛋白朊粉末(buffered peptone-water powder)··· 7 g  
葡萄糖(glucose)..... 5 g  
磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)..... 5 g  
蒸餾水 ..... 1000 mL  
加熱溶解後，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。

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

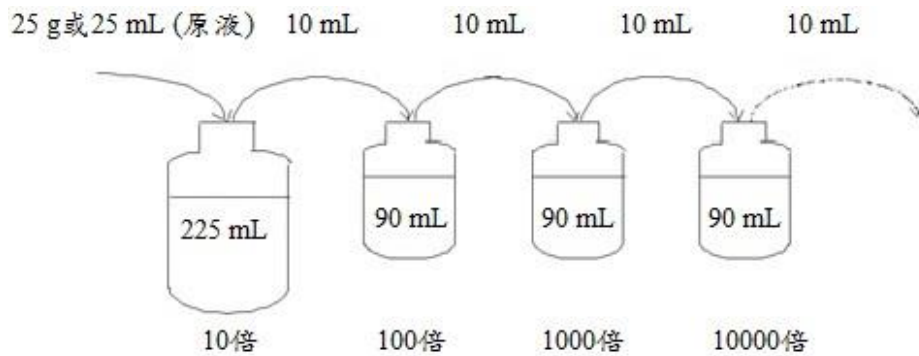
胨蛋白朊3號(proteose peptone No.3)..... 10 g  
牛肉抽出物(beef extract) ..... 1 g  
氯化鈉 ..... 5 g  
溴甲酚紫(bromocresol purple).....0.02 g



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：  
取葡萄糖、粟糖苷、麥芽糖、甘露糖醇各5 g，分別以上述之培養液稀釋後，取2.5 mL，分裝入試管內，以118°C滅菌10分鐘，最終pH值為 $6.8 \pm 0.2$ 。  
鼠李糖、木糖利用試驗用培養液：  
分別取適量經過濾滅菌之5%鼠李糖、木糖溶液，以已滅菌、分裝之紫色碳水化合物培養液稀釋，使其最終濃度為0.5%，取2.5 mL，分裝入試管內，最終pH值為 $6.8 \pm 0.2$ 。

### 2.3. 檢液之調製<sup>(註2-3)</sup>

- 2.3.1. 固態檢體：檢體適當切碎、混勻後，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：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎、混勻後，取25 g，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.3. 液態檢體：檢體混勻後，取25 mL，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.4. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等檢體，經適當攪拌混勻後，取25 g，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。
- 2.3.5. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ ，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(如 $45^{\circ}\text{C}$ 以下之水浴，15分鐘內解凍者)。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，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊，取25 g，加入增菌培養液225 mL，混合均勻，作為10倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 。
- 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，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應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：檢體總量不足25 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之稀釋液，作成10倍稀釋檢液。

## 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°C培養4小時，分別加入經過濾除菌之0.5%吡啶黃素溶液0.5 mL、0.5%萘利啶酸鈉鹽溶液2 mL及含1%環己胺之40%乙醇溶液1.25 mL，繼續培養至48小時，接續2.4.2.節，於培養24及48小時後各以棉棒沾取增菌液塗抹於選擇性培養基，於35°C培養24~48小時。

### 2.4.1.2. 直接平板法(Direct plate count method)

2.4.1.2.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，進行適當之連續稀釋。

2.4.1.2.2. 各吸取每一稀釋檢液及(或)原液1 mL，置入3-5個選擇性培養基(例如：0.3 mL、0.3 mL及0.4 mL，總量為1 mL)，每一檢液至少做二重複。

2.4.1.2.3. 以已滅菌塗抹曲棒均勻塗抹乾後，於35°C培養24~48小時，觀察所形成菌落之生長狀態。

2.4.1.2.4. 選取含25~250個菌落之平板培養基予以計數，並接續2.4.2.3.節<sup>(註4)</sup>。

註4：各稀釋倍數之典型菌落數小於25個或大於250個時，則以最低或最高稀釋倍數之平板培養基予以計數。

#### 2.4.2. 選擇性培養基

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，另建議同時選用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屬。

2.4.2.2. 使用無菌棉花棒沾取2.4.1.1.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°C培養24~48小時，典型單核球增多性李斯特菌菌落呈灰至黑色，菌落周圍培養基顏色變深，部份生長較慢菌株，需再培養24小時。

2.4.2.3. 每個培養基挑取至少5個可疑菌落，接種於TSAYE培養基，30°C培養24~48小時，再另行接種於TSBYE培養液，30°C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，則依其使用說明挑取典型菌落接種於TSAYE培養基及TSBYE培養液，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。

(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。單核球增多性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培養基鈎菌，塗抹於載玻片上，加3%過氧化氫溶液1~2滴，觀察有無氣泡產生，產生氣泡者為正反應，否則為負反應。單核球增多性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20~25°C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。單核球增多性李斯特菌應為正反應。

2.4.3.4.  $\beta$ -溶血試驗( $\beta$ -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，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。單核球增多性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，分別接種於含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°C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。單核球增多性李斯特菌應為鼠李糖、葡萄糖、麥芽糖及粟糖甘正反應；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，加入歐普氏試劑溶液A 0.6 mL及歐普氏試劑溶液B 0.2 mL後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，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。單核球增多性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。單核球增多性李斯特

菌應為正反應。

#### 2.4.3.8. 氧化酶試驗(Oxidase test)：

自TSAYE培養基鉤取單一新鮮菌落(避免使用鎳鉻製品)，塗抹於含有氧化酶試劑試紙，10~15秒內變為深藍紫色者為正反應，否則為負反應。單核球增多性李斯特菌應為負反應。

#### 2.4.3.9. CAMP試驗(CAMP test)：

將試驗菌株*R. equi*及*S. aureus* (或*S. pseudintermedius*)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新鮮綿羊血培養基上，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，並同時接種已知單核球增多性李斯特菌菌液作為正對照組，接種時不交互重疊，須距*R. equi*及*S. aureus* (或*S. pseudintermedius*)各2~3 mm(如圖三)，於35°C培養24~48小時後觀察結果。靠近*S. aureus* (或*S. pseudintermedius*)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。單核球增多性李斯特菌應為正反應。

#### 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°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。單核球增多性李斯特菌應為負反應。

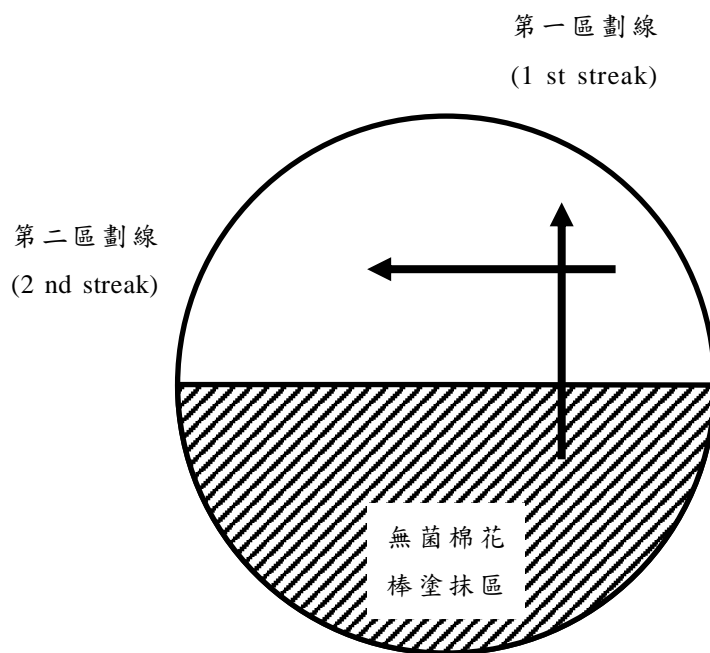
#### 2.4.3.11. 菌種保存

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超低溫冷凍櫃保存。

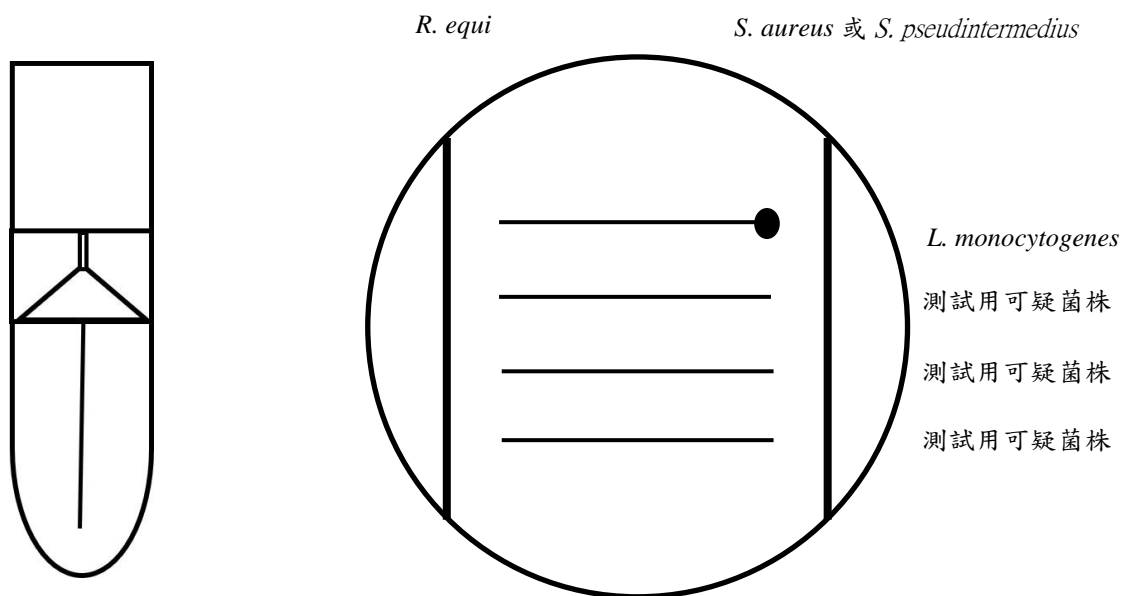
2.5. 判定：單核球增多性李斯特菌陽性者，應符合下表所列之結果：

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. 觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+
2. 革蘭氏染色	陽性(深紫色)、 無芽孢、短桿菌	無左述現象	+

3. 傘狀運動試驗	培養基上緣下3~5 mm出現傘狀	無左述現象	+
4. 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	+
5. 硝酸鹽還原試驗	紅紫色	原色	—
6. 氧化酶試驗	深藍色	非深藍色	—
7. 歐普氏試驗	粉紅色	原色	+
8. 甲基紅試驗	紅色	黃色	+
9. 鼠李糖利用試驗	黃色	紫色	+
10. 木糖利用試驗	黃色	紫色	—
11. 甘露糖醇利用試驗	黃色	紫色	—
12. 粟糖苷利用試驗	黃色	紫色	+
13. 葡萄糖利用試驗	黃色	紫色	+
14. 麥芽糖利用試驗	黃色	紫色	+
15. $\beta$ -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. 直接平板法菌數之計算

2.6.1.1. 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2.6.1.2.或2.6.1.3.節公式計算出檢體中單核球增多性李斯特菌數。

$$\text{比率(R)} = \frac{N_1}{N_0}$$

$N_0$ ：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

2.6.1.2. 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。記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)

$$= (\sum a) \times \frac{A}{V_A} \times R$$

$\Sigma a$ ：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

2.6.1.3. 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)

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

$\Sigma a$ ：A稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數總和

$\Sigma b$ ：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
    - 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°C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°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. 冰箱：能維持5 ± 3°C者。
    - 2.2.8. 冷凍櫃：能維持-20 ± 3°C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。
  - 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<sup>(註1)</sup>
      - 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1：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，分裝後於-20°C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<sup>(註2)</sup>

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：已滅菌，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2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

### 2.5. Real-time PCR溶液<sup>(註3)</sup>

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

5 $\mu$ M引子F .....	2.0 $\mu$ L
5 $\mu$ M引子R.....	2.0 $\mu$ L
5 $\mu$ M探針.....	1.0 $\mu$ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 $\mu$ L
檢體DNA溶液.....	5.0 $\mu$ L
無菌去離子水 .....	2.5 $\mu$ L
總體積.....	25.0 $\mu$ L

註3：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  $\times$ 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，振盪混合均勻，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，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°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，於-20°C冷凍保存。

### 2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

取一接種環之分離菌株，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  $\times$ 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°C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/ $\mu$ L及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗

### 2.7.1. Real-time PCR操作步驟<sup>(註4)</sup>

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。

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 變性	95	5
3. 黏接、延展	60	30

步驟2至步驟3，共進行45個循環反應。

註4：上述反應條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

### 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*或*Listeria spp.*。

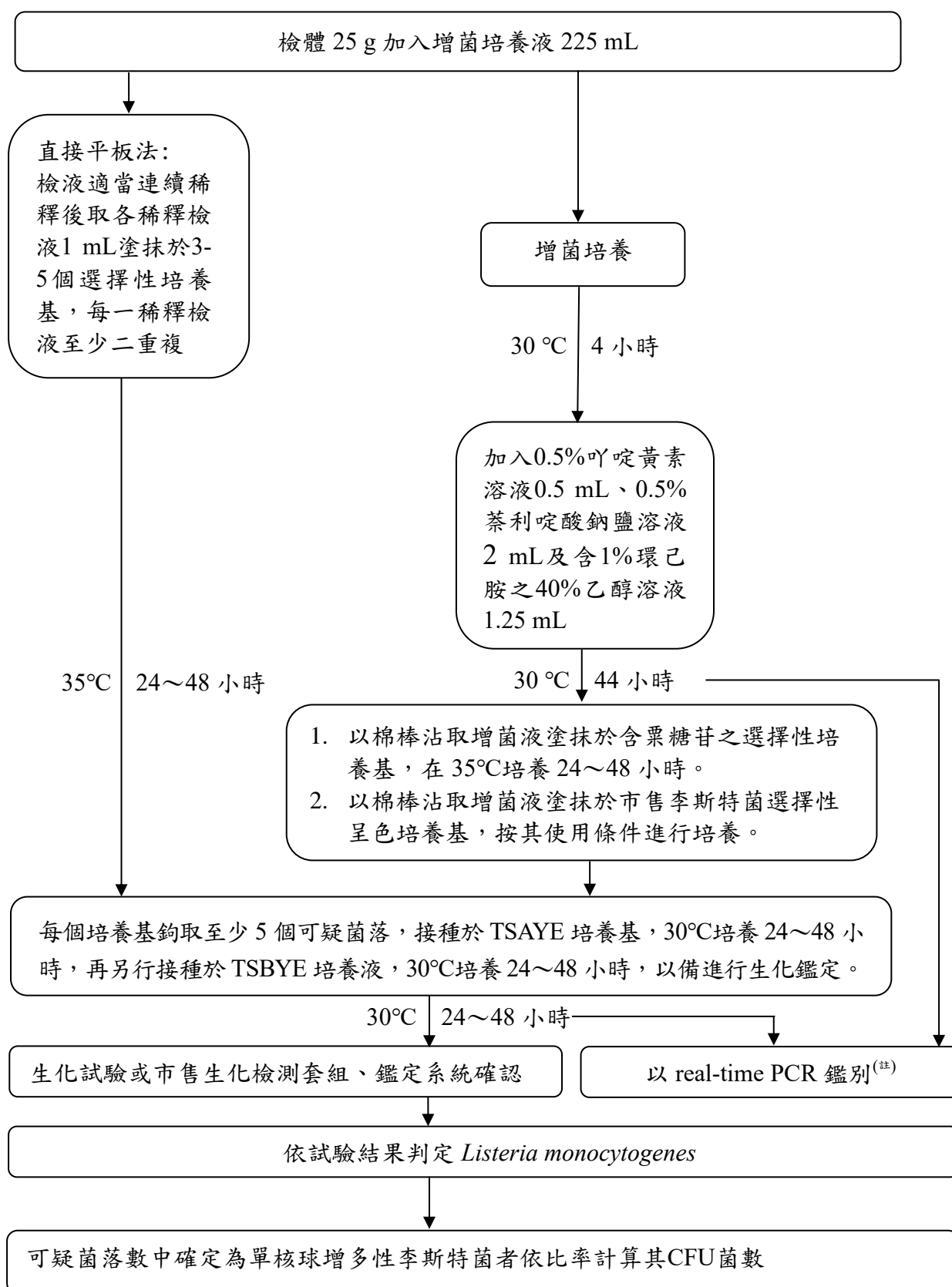
附註：第二部單核球增多性李斯特菌之real-time PCR檢測可視需要執行。

參考文獻：

Hitchins, A. D., Jinneman, K. and Chen, Y. 2022. 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>]

## 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。