

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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 *Listeria monocytogenes*

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：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°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：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. 酸鹼度測定試紙：pH值範圍為6~8。
 - 2.2.14. 旋渦混合器。
 - 2.2.15. 加熱器。
 - 2.2.16. 攪拌器。
 - 2.2.17. 振盪器。
 - 2.2.18. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.19. 光源：一般日光燈。
 - 2.2.20. 研鉢及杵。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

- 2.2.21. 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。
- 2.2.22. 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。
- 2.2.23. 試管：13 × 100 mm、16 × 150 mm試管或其他適用者。
- 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. 無菌棉花棒。
- 2.2.26. 載玻片及蓋玻片：用於染色及鏡檢用。
- 2.2.27. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.28. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.29. 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。
- 2.2.30. 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。
- 2.2.31. 吸管輔助器。
- 2.2.32. 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。
- 2.2.33. 微量吸管：10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。
- 2.2.34. 吸管尖：已滅菌，10 μL、20 μL、200 μL及1000 μL。
- 2.2.35. 無菌冷凍試管。
- 2.2.36. 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.37. 褐色試藥瓶。
- 2.2.38. 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)
- 2.2.39. 試藥：
 - 磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、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、

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

甘露糖醇(mannitol)、葡萄糖(glucose)、硝酸鉀(KNO₃；nitrite-free)、磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、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、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、冰醋酸、荼基乙二胺鹽酸鹽[N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride]、甲基紅(methyl red)、 α -荼酚(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、聚山梨醇酯80(polysorbate 80, Tween 80)及N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)均採用化學試藥級。酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、蛋白脛(peptone)、洋菜(agar)、胰化蛋白脛(tryptone)、胰化酪蛋白脛(trypticase peptone)、植物蛋白脛(phytone peptone)、胨蛋白脛(proteose peptone)、雷藍可粉末(Lab Lemco 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。

2.2.40. 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，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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

(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：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，置於褐色瓶，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，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘。

2.2.40.4. 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，再加蒸餾水至1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，冷藏備用。

2.2.40.5. 1%腸黏菌素溶液(1% Colistin solution)

取腸黏菌素1 g，溶於0.1 M之磷酸鉀緩衝液100 mL，冷藏備用。

2.2.40.6. 2%萘利啶酸溶液(2% Nalidixic acid solution)

取萘利啶酸鈉鹽2.0 g，溶於蒸餾水100 mL，過濾除菌，冷藏備用。

2.2.40.7. 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。

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

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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

- 2.2.40.10. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagents, VP reagent)
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，置入褐色瓶，冷藏備用。
- 2.2.40.12. 5 N醋酸溶液
取冰醋酸286 mL，加蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.40.13. 4%去血纖維蛋白馬血(或綿羊血)
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。
- 2.2.40.14. 0.25%吡啶黃素溶液
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。
- 2.2.40.15. 5%檸檬酸鐵胺溶液
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。
- 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. 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 ₂ PO ₄)	1.35 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	12.0 g
粟糖苷(esculin)	1.0 g

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

2% 萘利啉酸溶液(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。

2.2.41.2. 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(KH₂PO₄) …………… 1.35 g
磷酸氫二鈉(Na₂HPO₄) …………… 12.0 g
粟糖苷(esculin) …………… 1.0 g
2% 萘利啉酸溶液(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，分裝於試管，以121°C滅菌15分鐘，滅菌完成後應立即移出高壓滅菌釜冷卻，冷藏備用。使用前於每支試管內加入已過濾除菌之0.25%吡啶黃素溶液0.1 mL及5%檸檬酸鐵銨溶液0.1 mL。

2.2.41.3. 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°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.1，並用恆溫水浴方式，迅速冷卻至46°C，同時加入已過濾除菌之拉他頭孢溶液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)。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

2.2.41.4. 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°C滅菌15分鐘，置於46°C水浴中備用。

上層

將4%去血纖維蛋白馬血(或綿羊血)加入46°C溶解態之哥倫比亞血液基礎培養基中，充分混勻。

取溶解態之底層培養基10 mL，加入培養皿，凝固後再倒入上層培養基5~6 mL，冷藏備用，培養基顏色改變，應予捨棄。

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

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)15.0 g

植物蛋白朊(phytone peptone) 5.0 g

氯化鈉..... 5.0 g

洋菜(agar).....15.0 g

蒸餾水..... 1000 mL

加熱沸騰溶解後，以121°C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。

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

胨蛋白朊(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 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、麥芽糖及甘露糖醇5 g，溶解於上述之培養液後，取2.5 mL分裝入試管，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

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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%。

2.2.41.7. 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
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 2.5 g
葡萄糖(glucose)..... 2.0 g
洋菜(agar)15.0 g
蒸餾水 1000 mL

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，在冰箱貯存者應注意有無雜菌污染。

2.2.41.8. 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
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 2.5 g
葡萄糖(glucose)..... 2.0 g
蒸餾水 1000 mL

加熱完全溶解後，以121°C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，在冰箱貯存者於使用前應注意有無雜菌污染。

2.2.41.9. 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

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

蒸餾水950 mL
加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2，待冷卻至50°C，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，搖動時應避免產生氣泡。貯藏於冰箱備用，顏色發生變化者，應予捨棄。

2.2.41.10. 胰化酪蛋白大豆酵母抽出物培養基

(Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract, TSAYE)

胰化酪蛋白腴(trypticase peptone)15.0 g
植物蛋白腴(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 1000 mL
加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，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，搖動時應避免產生氣泡。

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)

胰化酪蛋白腴(trypticase peptone)17.0 g
植物蛋白腴(phytone peptone) 3.0 g
氯化鈉 5.0 g
磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)2.5 g
葡萄糖(glucose)2.5 g
酵母抽出物(yeast extract) 6.0 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. 硝酸鹽培養液(Nitrate broth)

牛肉抽出物(beef extract) 3.0 g
蛋白腴(peptone) 5.0 g
硝酸鉀(KNO₃; nitrite-free) 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，以

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

121°C滅菌12~15分鐘，最終pH值為 7.0 ± 0.1 。

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

胨蛋白朊(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，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 6.9 ± 0.2 。

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

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

加熱攪拌沸騰溶解後，分取8 mL注入附有螺旋蓋試管，以121°C滅菌15分鐘，冷卻備用，最終pH值為 7.4 ± 0.2 。

2.2.41.15. 營養培養基(Nutrient agar)

牛肉抽出物(beef extract) 3.0 g
蛋白朊(peptone) 5.0 g
洋菜(agar) 15.0 g
蒸餾水 1000 mL

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

2.3. 檢液之調製^(註1及2)

2.3.1. 固態檢體：檢體切碎混合均勻後，分別從其中取5份檢體(每份檢體稱取25 g)，將5份檢體混合成125 g，加入UVM培養液1125 mL混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

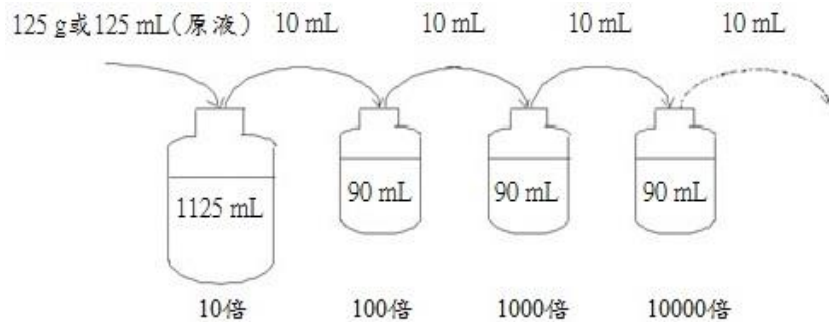
2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：用已滅菌之藥勺或其他用具加以混勻，分別從其中取5份檢體(每份檢體稱取25 g)，將5份檢體混合成125 g，加入UVM培養液1125 mL混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取125 mL，加入UVM培

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

養液1125 mL混合均勻，作為10倍稀釋檢液。

- 2.3.4. 蛋及蛋製品：混合均勻後，稱取25 g，加入UVM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2~5°C，18小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(45°C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，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，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°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UVM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棒頭部之棉絮鬆開，取溶出液供作檢液。
- 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°C滅菌15分鐘之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。
- 註 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. 鑑別試驗

2.4.1. 分離培養

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

2.4.1.1. 增菌培養

2.4.1.1.1. 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°C培養24±2小時，接續2.4.1.1.3。

2.4.1.1.2. 二次增菌培養：以無菌吸管取2.4.1.1.1.節之增菌液0.1 mL至10 mL費氏培養液，於35°C培養24~28小時，接續2.4.1.1.4.節。經24~28小時培養之費氏培養液仍無黑變現象時，需多培養24小時。

註：塗抹物檢體，則取增菌液1 mL至10 mL費氏培養液，培養條件同2.4.1.1.2。

2.4.1.1.3. 將2.4.1.1.1.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部分，再以接種環進行二區劃線(圖一)後，倒置於35°C培養24~48小時。觀察所形成菌落之生長狀態。單核球增多性李斯特菌在MOX培養基的典型菌落約1 mm，於24~28小時內菌落周邊即呈現黑環區，部分生長緩慢之菌株，需多培養24小時。

2.4.1.1.4. 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部分，再以接種環進行二區劃線(圖一)，倒置於35°C培養24~48小時。若費氏培養液及MOX培養基皆為負反應，可判定李斯特菌為陰性。

2.4.1.2. 最確數(Most Probable Number, 簡稱MPN)計數法：預期檢體中李斯特菌數低於10 CFU/mL或100 CFU/g時使用。

2.4.1.2.1. 將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，進行連續稀釋二次。

2.4.1.2.2. 分別吸取1 mL檢液及(或)原液，接種於9 mL UVM培養液，各接種三支(稱三階三支)，並於35~37°C培養24~48小時後，劃線培養於MOX培養基。

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MOX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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

- 2.4.1.3.3. 以已滅菌塗抹曲棒均勻塗抹乾後，倒置於35°C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，鉤取5個以上可疑菌落接種於HL培養基，供後續試驗使用。
- 2.4.1.4. 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，其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同屬菌株。
- 2.4.1.5. 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，挑取典型菌落接種於非選擇性培養基，以備進行後續生化試驗。
- 2.4.2. 溶血試驗
- 2.4.2.1. 自2.4.1.1.、2.4.1.2.或2.4.1.3.節之MOX培養基挑取5個以上可疑菌落，接種於HL培養基，於35°C培養18~26小時。
- 2.4.2.2. 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培養基、BHI培養液、TSAYE培養基及TSBYE培養液等非選擇性培養條件。
- 2.4.2.3. BHI培養基及BHI培養液需於18~25°C培養16~18小時；TSAYE培養基或TSBYE培養液需於35°C培養22~26小時，以備進行後續生化試驗。所有含可疑菌落之HL培養基應於室溫或冷藏保存至確認試驗完成。
- 2.4.3. 初步鑑別試驗
- 2.4.3.1. 運動性試驗：自2.4.2.3.節BHI培養基上鉤菌，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2.4.2.3.節之BHI培養基鉤取經培養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，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：

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

- (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。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。

2.4.4. 生化試驗：

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

自BHI培養基鉤菌，穿刺培養於運動性測試培養基中約1/2深，於20~25°C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*Rhodococcus equi*及*Staphylococcus aureus*接種於BHI培養基，培養隔夜後，以經0.85%無菌生理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，於35°C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控制組作為結果判讀之參考。

2.4.4.3. 觸酶試驗(Catalase test)：

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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，於35°C培養48±2小時後，取培養液1 mL至另一滅菌試管，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 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、粟糖苷為正反應；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，於35°C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°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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
 102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
 103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
 109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
 MOHWM0026.03

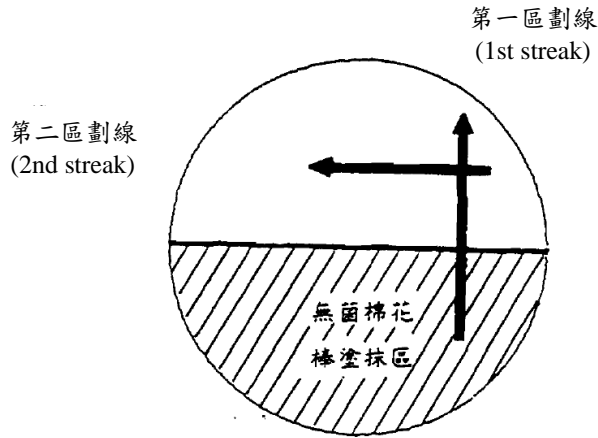
2.5. 判定：

單核球增多性李斯特菌陽性者，應符合下表所列之結果

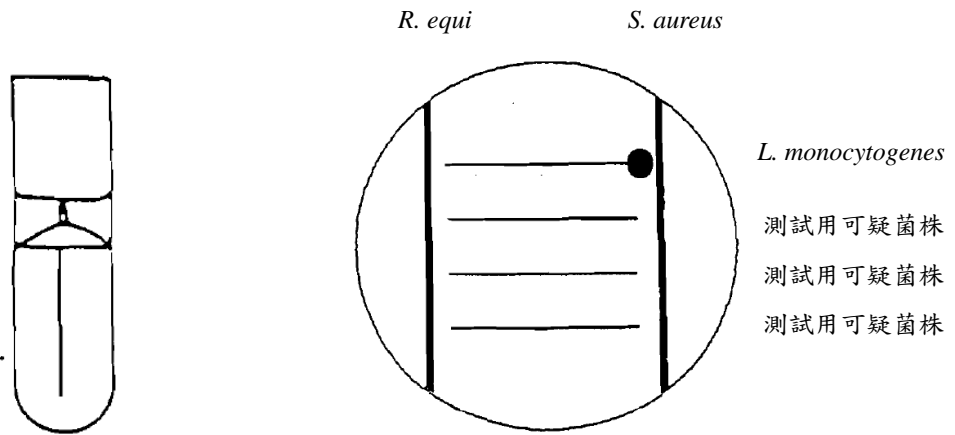
試驗或基質	正反應	負反應	單核球增多性李斯特菌之反應
1. 生長於MOX培養基之典型菌落外觀特徵	小菌落，周邊產生黑色沈澱	菌落周邊無黑色沈澱產生	+
2. 李斯特菌選擇性呈色培養基	視市售品牌之呈色原理判讀典型菌落	無典型菌落	+
3. 觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+
4. 革蘭氏染色	陽性(深紫色)、無芽孢、短桿菌	無左述現象	+
5. 傘狀運動試驗	培養基上緣下3~5 mm出現傘狀	無左述現象	+
6. CAMP試驗	與 <i>S. aureus</i> 相接處具溶血現象，與 <i>R. equi</i> 相接處則否	無左述現象	+
7. 硝酸鹽還原反應	紅紫色	原色	-
8. 氧化酶試驗	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	+

「+」表示90%以上為正反應

95 年 1 月 17 日署授食字第 0951100000 號公告修正
 102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
 103 年 1 月 9 日部授食字第 1021951354 號公告修正
 109 年 6 月 23 日衛授食字第 1091900915 號公告修正
 MOHWM0026.03



圖一、MOX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

95 年 1 月 17 日署授食字第 0951100000 號公告修正
 102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
 103 年 1 月 9 日部授食字第 1021951354 號公告修正
 109 年 6 月 23 日衛授食字第 1091900915 號公告修正
 MOHWM0026.03

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

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

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

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，

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

- (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=

$$\frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

- (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=

$$\frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

- (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=

$$\frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

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。

$$\text{比率(R)} = \frac{N_1}{N_0}$$

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。

- 2.6.2.2. 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)

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

$\sum a$ ：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。

- 2.6.2.3. 當有兩種稀釋倍數平板之菌落數在25~250時，先個別計

95 年 1 月 17 日署授食字第 0951100000 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
103 年 1 月 9 日部授食字第 1021951354 號公告修正
109 年 6 月 23 日衛授食字第 1091900915 號公告修正
MOHWM0026.03

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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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：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. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
 - 2.2.8. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
 - 2.2.9. 旋渦混合器。
 - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
 - 2.2.11. 水浴：維持水溫溫差在±1.0°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。
 - 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)

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。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

引子F：Lm835F

5'-AACTGGTTTCGTAAACGGTAAATACTTA-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^(註3)

2.4.1. 微量吸管：2 µL、10 µL、20 µL、100µL、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 Real-Time PCR System。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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°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

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°C冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行檢體DNA原液之製備。

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
MOHWM0026.03

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/ μ L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 μ L入real-time PCR反應盤的反應孔，各別加入檢體DNA溶液5 μ L，再將real-time PCR反應盤以200 \times 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		
<i>Listeria monocytogenes</i>	60	30
<i>Listeria spp.</i>	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*。

95 年 1 月 17 日署授食字第 0951100000 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
103 年 1 月 9 日部授食字第 1021951354 號公告修正
109 年 6 月 23 日衛授食字第 1091900915 號公告修正
MOHWM0026.03

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。

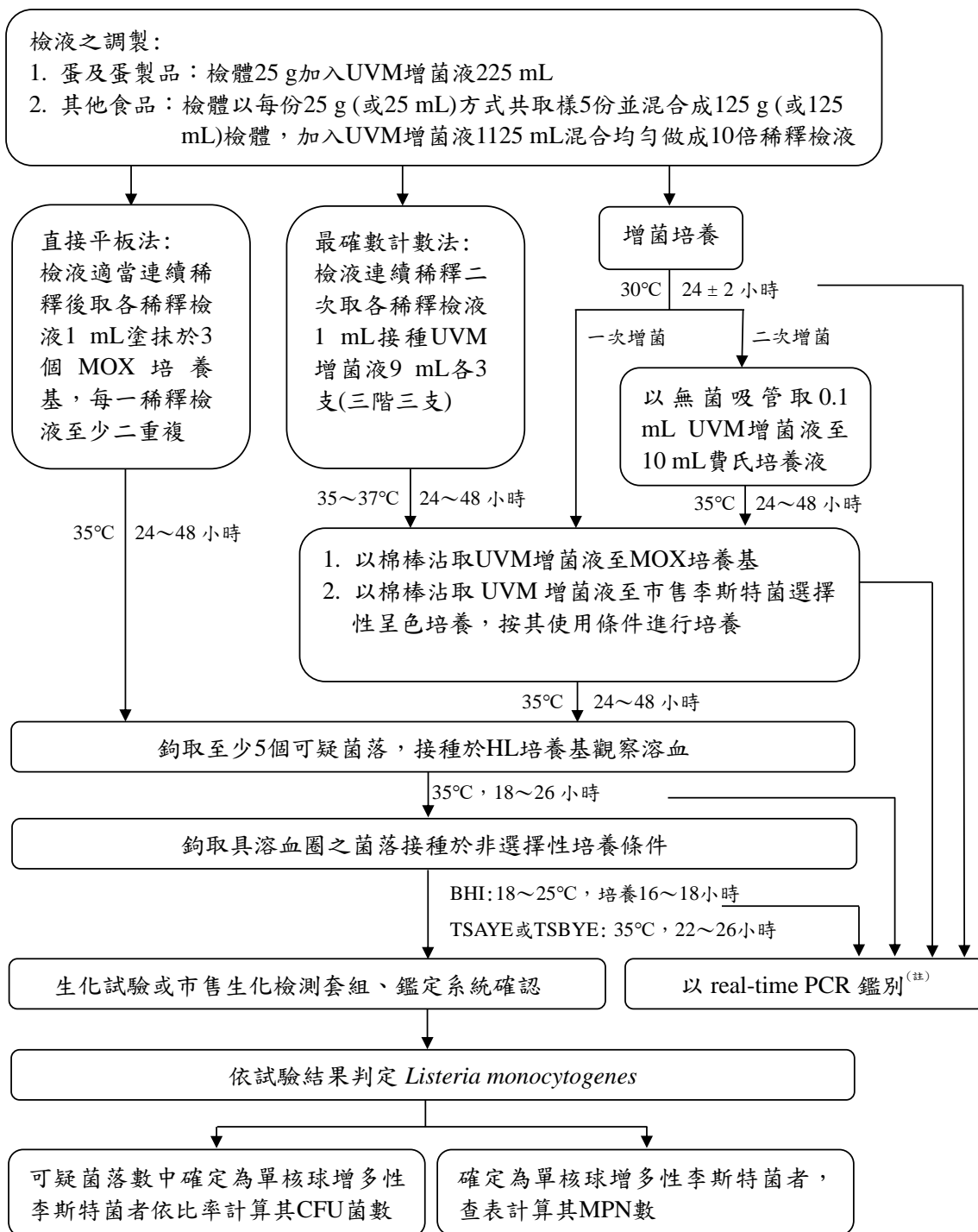
附註：第二部單核球增多性李斯特菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

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. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10.
[<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes>]

95年1月17日署授食字第0951100000號公告修正
 102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
 103年1月9日部授食字第1021951354號公告修正
 109年6月23日衛授食字第1091900915號公告修正
 MOHWM0026.03

檢驗流程圖



註：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。