

寵物食品中微生物之檢驗方法－李斯特菌之檢驗

Methods of Test for Pet Foods Microorganisms - Test of *Listeria monocytogenes*

1. 適用範圍：本方法適用於寵物食品中李斯特菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，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 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 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)、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(cefotetan)、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-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)、 α -萘酚(α -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。
 - 2.3 器具及材料
 - 2.3.1 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。

- 2.3.2 乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.3 高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。
- 2.3.4 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.5 冷凍櫃：能維持 $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.6 超低溫冷凍櫃：能維持 $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 者。
- 2.3.7 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.8 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 2.3.9 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
- 2.3.10 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。
- 2.3.11 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。
- 2.3.12 酸鹼度測定儀。
- 2.3.13 旋渦混合器。
- 2.3.14 離心機。
- 2.3.15 加熱器。
- 2.3.16 攪拌器。
- 2.3.17 振盪器。
- 2.3.18 光源：一般日光燈。
- 2.3.19 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。
- 2.3.20 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。
- 2.3.21 試管：13 × 100 mm、16 × 150 mm 試管或其他適用者。
- 2.3.22 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。
- 2.3.23 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。
- 2.3.24 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.3.25 酸鹼度測定試紙：pH 值範圍為 6~8。
- 2.3.26 藥勺、剪刀、小刀、鑷子、研鉢及杵：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.3.27 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.3.28 無菌棉花棒。

2.3.29 吸管輔助器或微量吸管。

2.3.30 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。

2.3.31 微量吸管：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.3.32 吸管尖：已滅菌，10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

2.3.33 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。

2.3.34 濾紙。

2.3.35 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。

2.3.36 無菌冷凍試管。

2.3.37 褐色試藥瓶。

2.3.38 試驗菌株

Staphylococcus pseudintermedius (ATCC 49444; BCRC14980)，

Staphylococcus aureus (ATCC 25923; BCRC10781)，

Rhodococcus equi (ATCC 6939; BCRC12859)，

Listeria monocytogenes (ATCC 19111; BCRC 14845、ATCC 19115; BCRC 15352)。

2.4 試劑

2.4.1 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。

2.4.2 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。

2.4.3 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。

2.4.4 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。

2.4.5 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。

2.4.6 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。

2.4.7 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。

2.4.8 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。

2.4.9 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。

溶 液 B：取 氫 氧 化 鉀 40 g 溶 於 蒸 餾 水 使 成 100 mL

2.4.10 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。

2.4.11 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 以 121°C 滅 菌 15 分 鐘 冷 藏 備 用。

2.4.12 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。

2.4.13 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。

2.4.14 5 N 醋酸溶液

取 冰 醋 酸 286 mL 加 蒸 餾 水 使 成 1000 mL。

2.4.15 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。

2.4.16 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。

2.5 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註 1)

2.5.1 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。

2.5.2 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。

2.5.3 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。

2.6 培養基

2.6.1 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(NaCl)	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°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。

2.6.2 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(NaCl)	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°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。

2.6.3 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。

2.6.4 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(NaCl) 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，充分混勻後，分裝於培養皿，最終 pH 值為 7.2±0.1。

2.6.5 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)。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone) 17 g

植物蛋白胰(phytone peptone) 3 g

氯化鈉(NaCl) 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。

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

胰化酪蛋白胰(trypticase peptone) 15 g

植物蛋白胰(phytone peptone) 5 g

氯化鈉(NaCl) 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。

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

牛肉抽出物(beef extract) 3 g

蛋白胰(peptone) 10 g

氯化鈉(NaCl) 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。

2.6.9 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。

2.6.10 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(KNO₃ ; 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。

2.6.11 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 注入試管內，以 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.6.12 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(NaCl) 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±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±0.2。

2.7 檢液之調製^(註 1)

以無菌操作稱取檢體 25 g，置於無菌鐵胃袋或已滅菌均質杯內。加增菌培養液 225 mL，均質 2 分鐘。將已均質化之檢體混合液供作檢液。

註 1：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如 Tween 80，使其於檢液中濃度為 1%)，並充分振搖，使之乳化。

2.8 增菌培養

增菌培養：將 2.7 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% 茶利啉酸鈉鹽溶液 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 2.9 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。

2.9 分離培養

2.9.1 選擇性培養基之選用：由 OXA 培養基、PALCAM 培養基及 MOX 培養基等含粟糖甘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，有助於區分李斯特菌及其他李斯特菌屬。

2.9.2 使用無菌棉花棒沾取 2.8 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°C 培養 24~48 小時，典型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。

2.9.3 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。

2.10 鑑定試驗

2.10.1 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。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。

2.10.2 生化試驗

2.10.2.1 觸酶試驗(Catalase test)：

自TSAYE培養基鉤菌，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。李斯特菌應為正反應。

2.10.2.2 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°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。李斯特菌應為正反應。

2.10.2.3 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°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。李斯特菌具微弱溶血現象，應為正反應。

2.10.2.4 醣類利用試驗(Carbohydrate utilization test)：

自TSBYE培養液鉤菌，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。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。

2.10.2.5 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°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。李斯特菌應為正反應。

2.10.2.6 甲基紅試驗(MR test)：

將2.10.2.5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。

2.10.2.7 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。李斯特菌應為負反應。

2.10.2.8 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。李斯特菌應為正反應。

2.10.2.9 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。李斯特菌應為負反應。

2.11 判定：李斯特菌陽性者，應符合下表所列之結果。

備註：1. 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。

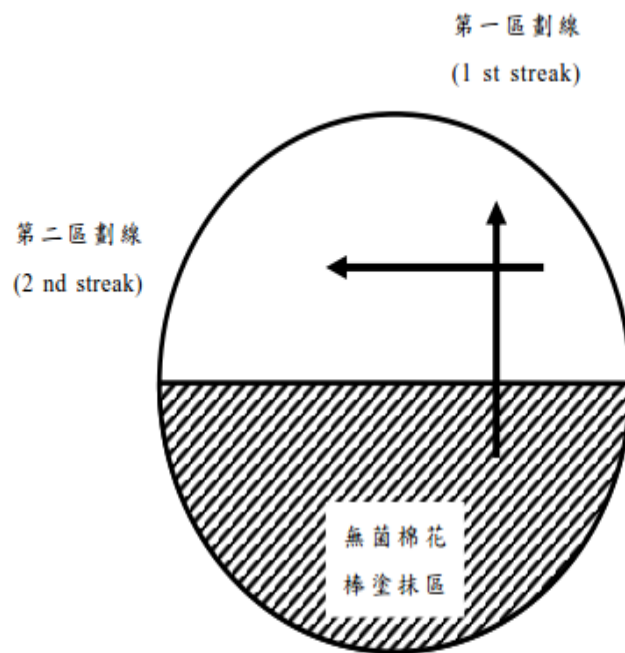
2. 孕婦與潛在的免疫功能不正常的個體禁止接近李斯特菌的檢驗工作區域。

參考文獻

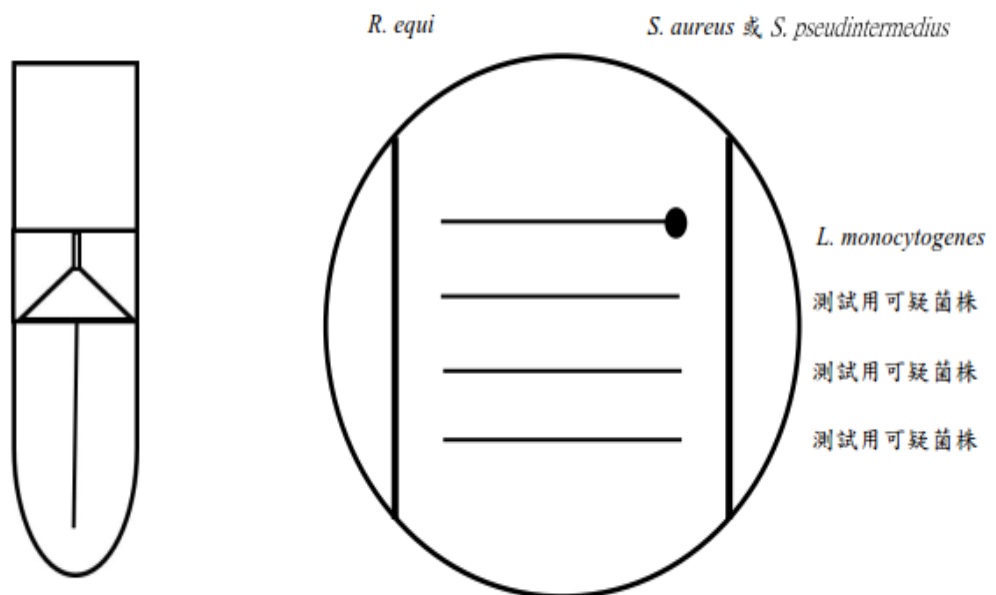
1. 食品微生物之檢驗方法-食品中單核球增多性李斯特菌之檢驗。111 年 8 月 18 日衛授食字第 1111901489 號公告訂定。
2. Hitchins, A. D., Jinneman, K. and Chen, Y. 2022. Chapter 10 Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Bacteriological Analytical Manual.
[<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes>]

表、李斯特菌之生化反應

試驗	正反應 (+)	負反應 (-)	李斯特菌之反應
革蘭氏染色	陽性(深紫色)、無芽孢、短桿菌	無左述現象	+
觸酶試驗	氣泡產生	無氣泡產生	+
傘狀運動試驗	培養基上緣下 3~5 mm 出現傘狀	無左述現象	+
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	+
硝酸鹽還原試驗	紅紫色	原色	—
氧化酶試驗	深藍色	非深藍色	—
歐普氏試驗	粉紅色	原色	+
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
鼠李糖利用試驗	黃色	紫色	+
木糖利用試驗	黃色	紫色	—
甘露糖醇利用試驗	黃色	紫色	—
粟糖苷利用試驗	黃色	紫色	+
葡萄糖利用試驗	黃色	紫色	+
麥芽糖利用試驗	黃色	紫色	+
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

檢驗流程圖

