

規定，若二者間未有足夠且適當之溝通與協調，常會造成廠商無所適從之困擾，因而延誤產品開發與上市，此亦嚴重影響生技產業之發展，故應整合醫政、藥政醫療器材臨床試驗法規。

(六)、積極參與國際活動，評估中華台北可提供之議題

我國長久以來極思能突破外交困境，參與國際活動，與各國建立良好關係及友誼，以便繼成功加入世界貿易組織WTO後，亦能進入世界衛生組織WHO，同時提昇國際地位及形象，進一步與各國建立實質外交關係。亞太經合會APEC應為一極佳之平台，尤其此生命科技創新論壇屬技術性議題，可能受到之政治干擾較少，各單位應思考評估可提供之議題為何。例如衛生署及醫藥品查驗中心於2003年11月中，在台北舉辦之「2003年APEC醫藥法規交流研討會」，即為一成功之案例。除此之外，中草藥之應用、成份、安全與檢測等，已逐漸引起亞太各國之注意，此次會議中亦有不少中草藥廠商參加，提出相關問題討論，此方面未來應有無限之發展潛力。



方紹威

曲狀桿菌之特性與分佈

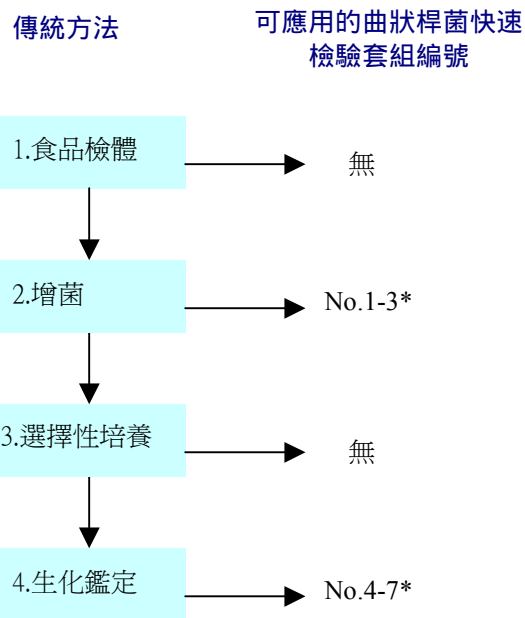
曲狀桿菌 (*Campylobacter* spp.) 係菌體纖細 (長 1.5-6.0 μm , 寬 0.2-0.5 μm) 之革蘭氏陰性菌，具微好氧性 (microaerophilic)，對 21% 氧氣敏感，最適生長之空氣組成是含 2-10% 氧氣及 13-15% 二氧化碳 (Hunt, *et al.*, 1998; Smibert, 1984)。在 30 或者 47 下，*C. jejuni*、*C. coli* 和 *C. lari* 無法生長，它們最適的生長溫度是在 42-45 之間 (Hunt, *et al.*, 1998; Morris and Patton, 1985; Smibert, 1984)。菌體在形態上的變化極大，於培養早期呈 "S" 或螺旋狀，培養 48 小時後的老菌則多呈球狀 (Hunt, *et al.*, 1998; Morris and Patton, 1985; Smibert, 1984)。其中以 *C. jejuni* 和 *C. coli* 最為常見，而 *C. jejuni* 佔人體分離菌株高達 99%。人體感染曲狀桿菌病症 (campylobacteriosis) 的最低 *C. jejuni* 菌量為 4 CFU/g (Skirrow, 1990)。引起人類的腸胃炎症狀包括下痢、嚴重腹瀉和血便，潛伏期 2-5 天。早在 1977 年，即有報告認為該菌是引起人類腸胃炎的病原菌 (Skirrow, 1977)，並有很多的報告指出曲狀桿菌中的 *C. jejuni* 是最常引起人類腸胃道感染的菌株，其引發腸胃炎的比率高於由沙門氏桿菌或志賀氏桿菌所引起者 (Stern and Kazmi, 1989; Tauxe, 1992)。在許多已開發的國家中，*C. jejuni* 已成為人體細菌性腸胃炎病症的主要原因 (Stern and Kazmi, 1989; Tauxe, 1992; Nielsen *et al.*, 1997)。嚴重的曲狀桿菌病症可能會發展為「急性脫髓鞘性神經炎」又稱為「基安-巴瑞症候群」(Guillain-Barre's syndromes, 簡稱 GBS) 和一種變異型的 GBS - Miller-Fisher syndromes (Yuki and Miyatake, 1998)。人體曲狀桿菌疾病大多數呈現明顯的散發性 (sporadic)，而且病例的分佈與季節有關，在北半球，人體病例常發生在 6 月至 9 月間 (Kapperud *et al.*, 1992; Tauxe, 1992)。曲狀桿菌存在於很多野生或飼養的動物之腸道內，例如家禽類、豬、牛、羊、寵物和水鳥等常存有這些細菌 (Butzler and Oosterom, 1991; Nielsen *et al.*, 1997; Skirrow, 1990)。雖然在一些病例中，由動物宿主和環境等來源傳至人體的傳播途徑尚

未確認，但是食品中毒案例經由傳染病學的研究和數據的整理，已顯示受到污染的飲用水、未經巴斯德殺菌的牛乳、食用或處理已受到污染的禽肉產品等皆是與人體感染此疾病有關的重要危害因子 (Kapperud *et al.*, 1992; Tauxe, 1992)。

曲狀桿菌的檢測方法

傳統方法在分離和鑑定曲狀桿菌的過程中，以增菌培養液和選擇性培養基最具關鍵性及重要性。由於曲狀桿菌對培養基的要求嚴格，而且它們在選擇性培養基的最適生長溫度為 42-43 °C，有別於一般人體腸道內病原菌之生長溫度，並且須在微好氣狀態下預先增菌培養，是以在早期其重要性一直被忽視。所幸最近幾年，有更多的學者專注於此，發展出數種預先增菌培養液及選擇性培養基，使得該菌的分離技術更上一層樓（見附件）。

然而，分離該菌所須之預先增菌及增菌步驟過於耗時、耗費人力，實有簡化的必要（圖一）。除此之外，傳統上曲狀桿菌菌種的鑑定，主要是憑藉一些傳統的生化學試驗，經常是既耗費人力又浪費時間（至少需要五-七天），因此亟須發展出較傳統檢測方法更為快速、簡便、準確和經濟的檢測方法，乃為目前極力追求之目標，這些重點包括(1)傳統檢測方法之改良，(2)檢測方法之儀器化，(3)生化、免疫及遺傳方法之高度應用，(4)檢測試劑之套組或系統化（表一和表二）。



*套組編號 1-7 之詳細資料見表二

圖一、食品中曲狀桿菌的傳統與快速檢測方法流程圖

Fig. 1. The diagram of conventional method and rapid detection method for *Campylobacter* spp. in food

表一、基因及免疫的檢測方法之應用

Table 1. Application of genetic and immunological detection methods

樣品	相關特徵
食品	<ul style="list-style-type: none"> ● 有非常低的目標物濃度 ● 來自食品中的干擾物質非常多 ● 一般不能對低目標物濃度直接檢測 ● 樣品必須經過濃縮和純化，例如：飲料 ● 稀釋後才選擇採用 immunocapture 或塗抹 ● 精準度主要是隨靈敏度而異
食品，經預先增菌培養的	<ul style="list-style-type: none"> ● 低的目標物濃度(10^4 CFU/mL) ● 來自食品中的干擾物質非常多 ● PCR*檢測的應用，某些食品需要純化以去除抑制物質 ● 免疫分析法通常不能直接應用，immunocapture 通常在檢測前先增菌 ● 精準度決定於靈敏度及專一性上
食品，經選擇性增菌培養的	<ul style="list-style-type: none"> ● 高的目標物濃度($> 10^5$ CFU/mL) ● 具有低至中度數量的食品干擾物質 ● 免疫分析法，DNA 雜交法及 PCR 檢測都可應用 ● 精準度大多決定於檢測的專一性上
環境的	<ul style="list-style-type: none"> ● 隨樣品中的目標物層次及干擾物質而異 ● 何種檢測方法的應用係依據樣品型式及所要求的靈敏度而異

樣品	相關特徵
菌落	<ul style="list-style-type: none"> ● 最高的目標物層次 ● 沒有來自樣品的干擾 ● 所有的方法都可應用，最簡單與最少成本的方法是凝集反應 ● 對於分析法的專一性之要求視該方法是否使用在最後的確認步驟上。

*PCR：polymerase chain reaction.

表二、市售曲狀桿菌快速檢測套組

Table 2, Commercial rapid detection kits for *Campylobacter* spp.

NO.	商 品 名	套組形式	檢測步驟	製造商	AOAC 認 可否	費用(NT\$/檢 測)
核酸雜交及免疫分析						
1	AccuProbe	DNA probe	2	GEN-PROBE	-	150
2	GENE-TRAK	DNA probe	2	GENE-TRAK	-	250
3	VIDAS® CAM	ELISA	2	bioMerieux	-	713
4	Campyslide®	LAT	4	Becton Dickinson	-	140
5	INDX®-Campy(jcl)™	LAT	4	Integrated Diagnostics	-	140
6	Microscreen® Campylobacter	LAT	4	Microgen Bioproducts	-	150
迷你生化鑑定套組						
7	API CAMPY	生化試驗	4	bioMerieux	-	558

附件

食品中曲狀桿菌之傳統檢驗方法

1. 適用範圍：本方法適用於食品中曲狀桿菌之檢驗。

2. 檢驗方法

2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度約為 100 呎燭光，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 乾熱滅菌器。

2.2.2 高壓滅菌釜。

2.2.3 冰箱：能維持 5±3℃。

2.2.4 吸管：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 之刻度。

2.2.5 吸管輔助器(Pipette aid)。

2.2.6 培養皿：已滅菌，內徑約 90-100 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。

2.2.7 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。

2.2.8 稀釋或增菌用容器：400 mL 或 3.5 L 之無菌袋或過濾型無菌袋；有 90 mL 或 450 mL 標記附蓋(栓)之廣口瓶。

2.2.9 水浴：能維持水溫溫差在±0.2℃以內者。

2.2.10 培養箱：能維持內部溫度溫差在±1.0℃以內者。

2.2.11 厭氧容器 (Anaerobe container)：體積容量 3-3.4 L，具有真空壓力表和調節閥，配合含有微好氧混合氣體 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 之鋼瓶和抽真空設備，或微好氧混合氣體產生之化學藥劑包(gas-generating envelope)；或體積容量 2.5 L 或 9.5 L，無真空壓力表和調節閥，配合微好氧混合氣體產生之化學藥劑包；或體積容量 2.5 L 或 5.5 L 之長方形厭氧容器，配合微好氧混合氣體產生之化學藥劑包。放入厭氧容器的無菌袋，不能裝入超過 125 mL 的培養液，且無菌袋亦不能緊密封口。當無菌袋置入長方形厭氧容器時，可先用鋁箔紙製作高度較深的鉛盤，然後將鉛盤用膠帶黏在無菌袋底，再放入厭氧容器內，以防止培養液傾倒出來。具有真空壓力表的容器蓋勿撞及硬物，以免指針失準。存放具有螺旋夾的厭氧容器時，可將螺旋夾置入容器內頂住容器蓋，促使空氣流通，以避免容器內因潮濕而長黴。厭氧容器使用完畢，應以 70%乙醇擦洗後拭乾存放。

- 2.2.12 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。
- 2.2.13 試管：15 × 150 mm 試管或其它適用者。
- 2.2.14 無菌濾膜：孔徑 0.22 μm 及 0.45 μm，直徑 25 mm、47 mm、≥ 90 mm 的親水性醋酸纖維濾膜。
- 2.2.15 微孔濾器：可放置 2.2.14 節無菌濾膜且應為無菌或可滅菌者。
- 2.2.16 光源：一般日光燈。
- 2.2.17 天平：可稱量到 6,000 g 者，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 200 g 者，靈敏度為 0.1 mg。
- 2.2.18 加熱板 (Hot plate)：具有磁性攪拌功能者。
- 2.2.19 離心機及離心管：可達 20,000 × g，而其無菌離心瓶容量 ≥ 250 mL 或無菌 (拋棄式) 離心管容量 ≥ 50 mL。
- 2.2.20 pH 測定儀。
- 2.2.21 pH 試紙：pH 值範圍 6-8。
- 2.2.22 回轉式振盪器：可達 25 rpm 者。
- 2.2.23 旋渦混合器 (Vortex mixer)。
- 2.2.24 顯微鏡：接物鏡 100 倍之位相差顯微鏡 (phase-contrast microscope) 或接物鏡 63 倍之暗視野顯微鏡 (dark-field microscope) 或接物鏡 1,000 倍之光學顯微鏡 (light microscope)。
- 2.2.25 載玻片及蓋玻片：適用於染色、鏡檢。
- 2.2.26 藥勺、鋁箔紙、剪刀、小刀、鑷子、紗布及牙籤：可滅菌者。
- 2.2.27 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.28 酒精燈、直徑 0.25 英寸濾紙片及褐色試藥瓶。
- 2.2.29 麥克法蘭濁度標準組 (McFarland nephelometer standard units)
- 2.2.30 試藥：氯化鈉、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、氫氧化鈉、結晶紫、草酸銨、馬尿酸鈉、碘化鉀、碘、30%過氧化氫、醋酸、醋酸鉛濾紙條、乙醇、甲醇、丁醇、異丙醇、丙酮、甘油、乳白蛋白水解物、葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘胺酸、半胱胺酸鹽酸、酪蛋白水解物、碳酸鈉、檸檬酸鈉、硝酸鉀、磺胺酸、α-萘酚、氯化氧化原血紅素、去氧膽酸鈉、鋅粉、硫酸銨亞鐵、硫酸亞鐵、偏亞硫酸氫鈉、α-酮麩胺酸、丙酮酸鈉、硫代硫酸鈉、鹼性復紅、酚紅、溴麝香草藍、中性紅、次氯酸鈉、頭孢匹拉肟鈉、乳酸三甲氧苄胺嘧啶、三甲氧苄胺嘧啶、萬古黴素、環己亞醯胺、立汎黴素、節絲菌素 B、多黏桿菌素 B 硫酸鹽、乙酸吡啶酯、水合茚三酮、N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽、那利得酸(30 μg) 濾紙片和塞吩頭孢菌素(30 μg) 濾紙片等均採用化學試藥級，蛋白胨、聚蛋白胨、豚蛋白胨、胰化蛋白胨、胰化蛋白胨、活性炭、牛胚胎血清、酵母抽出物、3 號膽鹽、溶胞馬血等採用微生物級。
- 2.2.31 培養基
- 2.2.31.1 曲狀桿菌增菌培養液(Campylobacter enrichment broth)
- a. 曲狀桿菌增菌基礎培養液(Campylobacter enrichment broth base)
- | | |
|----------------------------------|---------|
| 肉蛋白胨(meat peptone) | 10 g |
| 乳白蛋白水解物(lactalbumin hydrolysate) | 5 g |
| 酵母抽出物(yeast extract) | 5 g |
| 氯化鈉(NaCl) | 5 g |
| 氯化氧化原血紅素(haemin) | 0.01 g |
| 丙酮酸鈉(sodium pyruvate) | 0.5 g |
| α-酮麩胺酸(α-ketoglutaric acid) | 1 g |
| 偏亞硫酸氫鈉(sodium metabisulphite) | 0.5 g |
| 碳酸鈉(sodium carbonate) | 0.6 g |
| 蒸餾水 | 1000 mL |
- b. 溶胞馬血(lysed horse blood)
- 將無菌新鮮馬血約 50 mL 裝於 50 mL 無菌拋棄式離心管，以-20℃完全冷凍。重複解凍和冷凍步驟一次，使血球細胞完全破壞。製備好的無菌溶胞馬血，應於六個月內使用，未用完部分可再冷凍保存及解凍使用，此步驟可重複數次。
- c. 抗生素溶液
- 1) 頭孢匹拉肟鈉(sodium cefoperazone)溶液
- 取頭孢匹拉肟鈉 0.5 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL，續以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於 4℃可貯存 5 日，-20℃可貯存 14 日，-70℃可貯存 5 個月 (置入無菌塑膠試管或瓶內冷凍) 備用。該抗生素在培養液中的最終濃度為 20 mg/L。
- 2) i. 乳酸三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim lactate)溶液^(註)
- 取乳酸三甲氧苄胺嘧啶 0.66 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL，續以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於 4℃可貯存 1 年。該抗生



素在培養液中的最終濃度為 20 mg/L。

ii. 三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)溶液

取三甲氧苄胺嘧啶 0.5 g，置於 0.05 N 鹽酸 30 mL 中，利用具有磁性攪拌功能的加熱板，於 50°C 下攪拌至完全溶解後，加蒸餾水定容至 100 mL。此抗生素在培養液中的最終濃度為 20 mg/L。

註：i 或 ii 抗生素溶液可擇一使用。

3) 萬古黴素(vancomycin)溶液

取萬古黴素 0.5 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL，續以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於 4°C 可貯存 2 個月。該抗生素在培養液中之最終濃度為 20 mg/L。

4) 環己亞醯胺(cycloheximide)溶液

取環己亞醯胺 1.25 g，以乙醇 20-30 mL 溶解，再加蒸餾水定容至 100 mL 後，以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾，此抗生素溶液於 4°C 可貯存 1 年。該抗生素在培養液中之最終濃度為 50 mg/L。當無法購得環己亞醯胺時，可用 2.2.31.3 節之節絲菌素 B 溶液 5 mL 替代。

取增菌基礎培養液之各成分(儘可能使用附螺旋蓋的容器)，完全溶解後浸泡 10 分鐘，以 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4±0.2。使用前，加入無菌之溶胞馬血 50 mL 及上列抗生素溶液各 4 mL。該增菌基礎培養液應於兩星期內使用為最佳，惟以一個月內使用為限。

2.2.31.2 普雷斯頓曲狀桿菌增菌培養液(Preston broth for Campylobacter enrichment)

a. 基礎培養液

2號營養培養液(nutrient broth No.2)	25 g
肉抽出物(meat extract)	10 g
蛋白胍(peptone)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
蒸餾水	1000 mL

b. 立汎黴素(rifampicin)溶液

取立汎黴素 0.25 g，緩慢溶於裝有乙醇 60-80 mL 的 100 mL 容量瓶中，持續地漩渦攪拌，當粉末完全溶解後，再加入蒸餾水定容至 100 mL，再以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於-20°C 可貯存 1 年。該抗生素在培養基中的最終濃度為 10 mg/L。

c. 多黏桿菌素 B 硫酸鹽(polymyxin B)溶液

取 5 萬單位之多黏桿菌素 B 硫酸鹽，以蒸餾水溶解後定容至 50 mL，再以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於-20°C 可貯存 1 年。該抗生素在培養基中的最終濃度為 5000 IU/L。

取基礎培養液之各成分(儘可能使用附螺旋蓋的容器)，完全溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4±0.2。使用前，加入 2.2.31.1 節之無菌溶胞馬血 50 mL、乳酸三甲氧苄胺嘧啶溶液 2 mL 和環己亞醯胺溶液 8 mL，及本節之立汎黴素溶液 4 mL 和多黏桿菌素 B 硫酸鹽溶液 5 mL。當無法購得環己亞醯胺時，可用 2.2.31.3 節之節絲菌素 B 溶液 10 mL 替代。

2.2.31.3 阿貝塔-漢特-巴克培養基(Abeyta-Hunt-Bark agar, A-H-B agar)

a. 基礎培養基(basal medium)

牛心浸出物培養基 (heart infusion agar)	40 g
牛心 500 g 之浸出物(beef heart, infusion from 500 g)	
胰化蛋白胍(tryptose)	10 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
洋菜(agar)	15 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
蒸餾水	950 mL

b. 節絲菌素 B (amphotericin B)溶液

取節絲菌素 B 0.1 g，以蒸餾水溶解後定容至 100 mL，再以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此抗生素溶液於-20°C 可貯存 1 年。該抗生素在培養基中的最終濃度為 2 mg/L。

c. 硫酸亞鐵，偏亞硫酸氫鈉，丙酮酸鈉 (ferrous sulphate, sodium metabisulphite, sodium pyruvate, FBP)溶液，簡稱 FBP 溶液

取丙酮酸鈉 6.25 g，加蒸餾水 10-20 mL 溶解後，再加入硫酸亞鐵 6.25 g 和偏亞硫酸氫鈉

6.25 g，完全溶解後，加蒸餾水定容至 100 mL，再以具有 0.22 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。此 FBP 溶液對於光線敏感，且易於氧化，故應避光加蓋，適量配製使用，並應迅速冷凍，在-20℃貯存者限 1 個月內使用，在-70℃貯存者限 3 個月內使用。

取基礎培養基之各成分，加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50℃，加入 2.2.31.1 節之無菌溶胞馬血 50 mL 和頭孢匹拉肟鈉溶液 6.4 mL，2.2.31.2 節之立汎黴素溶液，及本節之節絲菌素 B 溶液 2 mL 和 FBP 溶液 2 mL，混合均勻，但應避免產生氣泡，立即倒入培養皿，每一培養皿約倒入 15~20 mL，放置過夜，使培養基表面乾燥。當天使用者，可置於 42℃培養箱中數小時，使其表面乾燥。不可掀開培養皿蓋風乾，以免抑制曲狀桿菌生長。

2.2.31.4 未含血液之曲狀桿菌改良培養基(Modified Campylobacter blood-free agar, mCCDA)

CCDA	45.5 g
2號營養培養液(nutrient broth No.2)	25 g
微生物級活性炭(bacteriological charcoal)	4 g
酪蛋白水解物(casein hydrolysate)	3 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)	1 g
硫酸亞鐵(ferrous sulphate)	0.25 g
丙酮酸鈉(sodium pyruvate)	0.25 g
洋菜(agar)	12 g
酵母抽出物(yeast extract)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50℃，加入 2.2.31.1 節之頭孢匹拉肟鈉溶液 6.4 mL，2.2.31.3 節之立汎黴素溶液 4 mL 及節絲菌素 B 溶液 4 mL 後，混合均勻，但應避免產生氣泡，立即倒入培養皿，每一培養皿約倒入 15-20 mL，放置過夜，使培養基表面乾燥。當天使用者，可置於 42℃培養箱中數小時，使其表面乾燥。不可掀開培養皿蓋風乾，以免抑制曲狀桿菌生長。

2.2.31.5 未含抗生素之阿貝塔-漢特-巴克培養基 (Abeyta-Hunt-Bark agar without antibiotics)

取阿貝塔-漢特-巴克培養基之各成分，加熱溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50℃，加入 2.2.31.1 節之 FBP 溶液 4 mL 混合均勻，但應避免產生氣泡，立即倒入培養皿，每一培養皿約倒入 15-20 mL，放置過夜，使培養基表面乾燥。

2.2.31.6 生化鑑定用半固態改良培養基 (Modified semisolid medium for biochemical identification)

曲狀桿菌增菌基礎培養液	27.6 g
洋菜(agar)	1.8 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分成4等份，每瓶含250 mL。其中3瓶均加入0.2%中性紅(neutral red)溶液2.5 mL，另外每瓶個別添加甘胺酸(glycine)2.5 g或氯化鈉7.5 g或半胱胺酸鹽酸(cysteine-HCl) 0.05 g。第4瓶則添加硝酸鉀2.5 g，不用添加中性紅溶液。每瓶混合均勻後，分取10 mL注入螺旋蓋試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

2.2.31.7 菌種短期保存用半固態改良培養基 (Modified semisolid medium for culture storage)

曲狀桿菌增菌基礎培養液	27.6 g
檸檬酸鈉(sodium citrate)	0.1 g
洋菜(agar)	1.8 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整pH值為7.4±0.2，分取10 mL注入螺旋蓋試管中，以121℃滅菌15分鐘。貯存時，拴緊螺旋蓋。

2.2.31.8 冷凍保存培養基(Freezing medium)(菌種長期保存用)

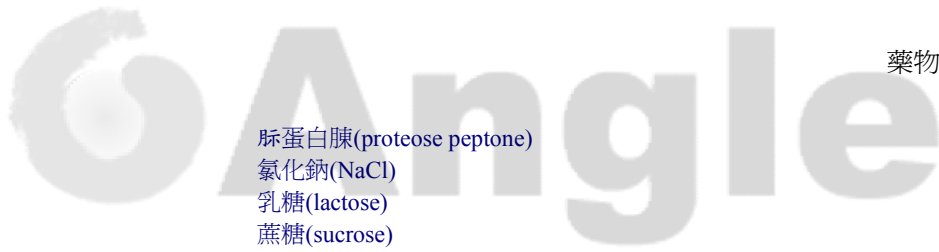
滅菌之曲狀桿菌增菌基礎培養液	9.5 mL
0.22 μm孔徑無菌濾膜過濾的牛胚胎血清 (fetal bovine serum)	1 mL
已滅菌10%甘油(glycerol)	1 mL

混合均勻後使用。

2.2.31.9 三糖鐵培養基(Triple sugar iron agar, TSI)

配方一：

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白腺(peptone)	15 g



豚蛋白脲(protose peptone)	5 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硫酸亞鐵(ferrous sulphate)	0.2 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	0.3 g
酚紅(phenol red)	0.024 g
洋菜(agar)	12 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取適量注入試管中至1/3滿，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2，滅菌後作成斜面培養基。

配方二：

聚蛋白脲(polypeptone)	20 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硫酸鉍亞鐵(ferrous sulphate)	0.2 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	0.2 g
酚紅(phenol red)	0.025 g
洋菜(agar)	13 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取適量注入試管中至1/3滿，以118°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2，滅菌後作成斜面培養基。

2.2.31.10 氧化-發酵葡萄糖半固狀培養基 (Oxidation-fermentation glucose semisolid medium, OF)

胰化蛋白脲(tryptone or trypticase)	2 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
磷酸氫二鉀(dipotassium phosphate)	0.3 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.03 g
洋菜(agar)	2 g
蒸餾水	1000 mL

取以上各成分，加入葡萄糖10 g，加熱溶解後，分取5 mL注入試管內，另外再稱取以上各成分(葡萄糖除外)，加熱溶解後，亦分取5 mL注入試管內，將上述兩種試管區分開來後，皆以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.8±0.2。

2.2.31.11 馬康奇培養基 (MacConkey agar)

豚蛋白脲(protose peptone)	3 g
蛋白脲(peptone)	17 g
乳糖(lactose)	10 g
3號膽鹽(bile salts No.3)	1.5 g
氯化鈉(NaCl)	5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

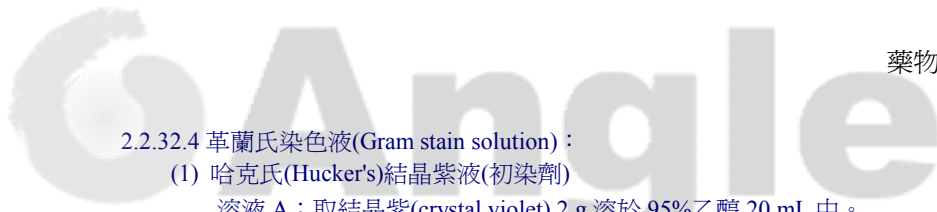
加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1±0.2。搖動混合均勻，但應避免產生氣泡，每一培養皿倒入約15-20 mL。製備後，3日內使用。

2.2.32 試劑：

2.2.32.1 0.85%生理食鹽水⁽¹⁾：取氯化鈉 8.5 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於稀釋用容器，以 121°C滅菌 15 分鐘。

2.2.32.2 磷酸鹽緩衝溶液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)：取磷酸二氫鉀 34 g 溶於蒸餾水 500 mL，俟完全溶解後，以 1 N 氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2，然後加蒸餾水為 1000 mL，以 121°C滅菌 15 分鐘後，貯存於冰箱中，作為原液備用。使用時，取原液 1.25 mL 加蒸餾水為 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C滅菌 15 分鐘。

2.2.32.3 0.1%蛋白脲稀釋液(0.1% peptone diluent)：取蛋白脲 1 g，溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。



- 2.2.32.4 革蘭氏染色液(Gram stain solution)：
- (1) 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)

溶液 A：取結晶紫(crystal violet) 2 g 溶於 95%乙醇 20 mL 中。

溶液 B：取草酸銨(ammonium oxalate) 0.8 g 溶於蒸餾水 80 mL 中。

將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。
 - (2) 革蘭氏碘液(媒染劑)

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g，置於研鉢中，經研磨 5-10 秒鐘後，加蒸餾水 1 mL 研磨，次加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水 中，將此溶液注入褐色試藥瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，加蒸餾水使溶液至 300 mL。此過程應於排氣櫃中進行
 - (3) 複染液(複染劑)

取鹼性復紅(basic fuchsin) 0.5 g 和石炭酸 4.5 g，溶於異丙醇：乙醇：蒸餾水(4：1：15, v/v)100 mL 中，以濾紙過濾，濾液供作複染液。
- 2.2.32.5 0.2%中性紅溶液(Neutral red solution)
- 取中性紅0.2 g，溶解於乙醇10 mL中，完全溶解後，加蒸餾水定容至100 mL。
- 2.2.32.6 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite detection reagents)
- 溶液 A：取磺胺酸(sulfanilic acid) 1 g 溶於裝有 5 N 醋酸 125 mL 的褐色試藥瓶中。
- 溶液 B：取 α -萘酚 (α -naphthol) 1 g 溶於裝有 5 N 醋酸 200 mL 的褐色試藥瓶中。
- 2.2.32.7 3%過氧化氫溶液(Hydrogen peroxide solution)
- 取 30%過氧化氫溶液 5 mL，加入裝有無菌水 45 mL 的褐色試藥瓶中，冷藏備用。
- 2.2.32.8 1%馬尿酸鹽溶液 (Hippurate solution)
- 取馬尿酸鈉(sodium hippurate)0.1 g 溶於蒸餾水 10 mL 中，以具有 0.22 μ m 孔徑無菌濾膜的微孔濾器進行無菌過濾。此溶液可分裝成 0.4 mL 避光貯存於-20 $^{\circ}$ C。
- 2.2.32.9 水合茚三酮溶液(Ninhydrin solution)
- 取水合茚三酮 3.5 g 溶於丙酮和丁醇(1：1, v/v)混合溶劑 100 mL 中，應冷藏備用，限一週內使用。
- 2.2.32.10 氧化酶試劑 (Oxidase reagent)
- 取 N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine.2HCl) 1 g 溶於蒸餾水 100 mL 中。置於褐色試藥瓶中冷藏備用，限一週內使用。
- 2.2.32.11 1 N 或 2 N 氫氧化鈉溶液
- 取氫氧化鈉 40 g 或 80 g，加蒸餾水 1000 mL，攪拌溶解。
- 2.2.32.12 0.1%次氯酸鈉溶液(sodium hypochlorite solution)
- 取 5.25%次氯酸鈉溶液 19 mL，加蒸餾水至 1000 mL，攪拌溶解。
- 2.2.32.13 1M 硫代硫酸鈉溶液
- 取硫代硫酸鈉 15.8 g 溶於蒸餾水 100 mL 中，攪拌溶解。以具有 0.22 μ m 孔徑無菌濾膜的微孔濾器進行無菌過濾。
- 2.2.32.14 對比染色液(Contrast stain)
- 取哈克氏結晶紫液與無菌生理食鹽水或磷酸鹽緩衝溶液，以 1：1 (v/v) 比例混合而成。
- 2.2.32.15 20%乙酸吡啶酯(Indoxyl acetate)溶液
- 取乙酸吡啶酯 0.5 g 溶於裝有丙酮 2.5 mL 的褐色試藥瓶中，振動溶解。
- 2.2.33 乙酸吡啶酯濾紙片。
- 滴 20%乙酸吡啶酯溶液 25 μ L 在濾紙片上，置於室溫下乾燥後，將製備好的濾紙片放入褐色試管內，再移入乾燥器中，於 4 $^{\circ}$ C 下儲存備用。

2.3 檢體之處理⁽²⁾⁽³⁾：

- 2.3.1 除 2.3.2 至 2.3.8 節以外之所有檢體：將過濾型無菌袋放在培養皿置放架上，以金屬固定夾固定。取檢體 25 g(蔬果類則稱取 50 g)置入袋中，加入滅菌之增菌培養液 100 mL 後，扭緊袋口，並以固定夾夾緊，再將無菌袋移入籃子或分格架內，以手輕微搖動 5 分鐘或放在振盪器上，以 25 rpm 振盪 5 分鐘後，靜置 5 分鐘，將增菌培養液傾入另一無菌袋中，並使殘渣滴乾。無過濾型無菌袋可供使用時，可先在無菌袋中以增菌培養液洗滌檢體，再傾入覆蓋有無菌紗布的漏斗中，以另一無菌袋收集增菌培養液。檢體屬酸性食品者(如雞肉沙拉)，取濾液，以 2N 氫氧化鈉溶液調整培養液 pH 值為 7.4。
- 2.3.2 去頭龍蝦或蟹螯之檢體：取檢體 50 至 100 g，置入過濾型無菌袋後，依 2.3.1 節洗滌檢體。
- 2.3.3 不易將重量減至 25 g 的整個屠體肉或檢體(如整隻兔、龍蝦或較大塊的野肉等)：將檢體置入 3.5 L 無菌袋後，加入已滅菌之稀釋液 200 mL，扭緊袋口，旋轉搖動內容物 10 分鐘。傾斜袋子，握住袋底內容物，使稀釋液流向一角。以 0.1%次氯酸鈉溶液或 70%乙醇消毒袋底邊角後，用無菌水洗滌，再用已滅菌剪刀剪去袋底邊角，傾入覆蓋有無菌紗布的漏斗中，

- 過濾至 250 mL 無菌離心瓶後，在 16,000 x g 下離心 15 分鐘。捨棄上清液後，加入稀釋液 10 mL，與離心沉澱物混合均勻做成懸浮液，吸取懸浮液 3 mL 至增菌培養液 100 mL。
- 2.3.4 液態蛋黃或全蛋混合物：先將檢體依成分分成兩部份，每部份取 25 g 置入增菌培養液 125 mL 中，溫和混合均勻後，此為 1：6 倍稀釋檢液。由 1：6 倍稀釋檢液，取 25 mL 移入另一增菌培養液 100 mL 中，此為 1：30 倍的稀釋檢液。檢驗 1：6 倍和 1：30 倍稀釋檢液。
- 2.3.5 剝殼甲殼類動物：依檢體大小不同適當取樣，以得到 100-200 g 殼內汁液和肉。將殼內汁液和肉置入已滅菌之攪拌均質器或其他適當的無菌容器中，經低速攪拌或鐵胃拍打 60 秒鐘後，取甲殼類動物均質物 25 g 置於 400 mL 無菌袋或 500 mL 無菌三角瓶中，再加入增菌培養液 225 mL，混合均勻後，此為 1：10 倍稀釋檢液。由此 1：10 倍稀釋檢液中，取 25 mL 加入增菌培養液 225 mL 混合均勻後，此為 1：100 倍稀釋檢液。1：10 倍和 1：100 倍稀釋檢液均需檢驗。使用厭氧容器培養時，應將增菌培養液分成兩部分，每部份體積為 125 mL，有助於氣體擴散至增菌培養液內部，以利曲狀桿菌之生長。
- 2.3.6 水：需先收集 2 至 4 L 水樣，對於含氯水樣，每公升水樣應加入 1M 硫代硫酸鈉溶液 5 mL。少量水樣可用具有 0.45 μm 孔徑無菌濾膜(47 mm)過濾。大量水樣，尤其是呈現混濁者，可用直徑 ≥ 90 mm 無菌濾膜過濾。當無菌濾膜阻塞住時，可戴上無菌手套，於無菌下打開微孔濾器，用無菌夾子移除濾膜後，放入另一無菌濾膜，再重新組合微孔濾器，繼續進行過濾。濾膜的使用量可依每件檢體的需求而定。當檢測海水或其他鹽水時，可在檢體即將全部通過濾膜之際，利用無菌磷酸鹽緩衝溶液 100 至 1,000 mL(依濾膜大小而定)沖洗濾膜上過多的鹽分，每張濾膜都要如此處理。因為曲狀桿菌對於乾燥與高鹽度非常敏感，應避免過濾時濾膜乾涸，且需立即將過濾後之濾膜移至增菌培養液。當使用大的濾膜時，可用無菌吸管將過濾完的濾膜分成數小片，以確保增菌培養液能完全覆蓋濾膜。當使用厭氧容器時，增菌培養液應儘量維持在 125 mL 或更少量，如果大於 125 mL 者應先將增菌培養液分成數部份，濾膜也應分成數部份。
- 2.3.7 塗抹物：取增菌培養液 10 mL 置入 50 mL 無菌的鋁箔紙封口之三角瓶中，每個三角瓶放入一支塗抹物，在三角瓶口下無菌拗斷塗抹物木柄，再用鋁箔紙寬鬆地覆蓋瓶口。將三角瓶放入厭氧容器，需疊成兩層者，可先在底層的三角瓶上放置一塊圓形硬紙板，紙板邊緣需留點空隙，以利氣體循環。
- 2.3.8 牛乳及冷凍乳製品：
- 2.3.8.1 生乳及其他性狀的牛乳：先用無菌吸管吸取檢體，滴在 pH 試紙上。當 pH 值 < 7.6 ，則用無菌的 1 N 或 2 N 氫氧化鈉溶液緩緩地調整 pH 值至 7.5 ± 0.2 。取檢體 50 g，以 20,000 x g 離心 40 分鐘後，傾掉上清液，離心沈澱物加入增菌培養液 10 mL，混合均勻後，再加入增菌培養液 90 mL。
- 2.3.8.2 冰淇淋和冷凍乳製品：檢體置於 2 至 5°C 下 18 小時內或 45°C 以下的水浴中 15 分鐘內解凍，解凍時應經常搖動檢體，使檢體解凍，以便在無菌操作下將所有的糖果和固體物質挑除掉。再依 2.3.8.1 節處理。
- 2.3.8.3 乾酪：取檢體 50 g，置於過濾型無菌袋中，加入已滅菌之稀釋液 50 mL，用鐵胃拍打 15-30 秒鐘，移去濾除的殘渣，並將殘渣滴乾 5 秒鐘後丟棄。再依 2.3.8.1 節處理。
- 2.3.8.4 濾網(擠奶時濾除固形物的金屬網)：放置濾網套件 50 g 於增菌培養液 100 mL 中。
- 註：1. 除肉製品使用 0.1% 蛋白胨稀釋液外，其他檢體通常使用之稀釋液為磷酸鹽緩衝溶液，其次為 0.85% 生理食鹽水。
2. 檢體之處理應使用無菌操作技術。
3. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡之檢體時，應加入適量之滅菌乳化劑(如 1% Tween 80)，並充分搖動，使之乳化。在處理冷凍食品檢體之前，應先於 2-5°C 下 18 小時內或 45°C 以下的水浴中 15 分鐘內解凍，解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體的解凍。
- 2.4 預先增菌和增菌
- 2.4.1 四小時預先增菌培養：檢體存放時間是在產製後 10 天內，或已遭受污染，或者檢體是乳製品時，在 37°C，微好氧培養 4 小時。
- 2.4.2 五小時預先增菌培養：當檢體為水樣、甲殼類動物或經冷凍冷藏存放超過 10 天(含 10 天)者，先以 30°C，微好氧培養 3 小時，再以 37°C，微好氧培養 2 小時。
- 2.4.3 增菌培養：在預先增菌培養後，將培養溫度提高至 42°C(檢測 *C. fetus*，則繼續在 37°C 培養)。除甲殼類動物和乳製品需培養 48 小時之外，其他檢體培養 28-29 小時(檢測 *C. fetus*，則培養 52 小時)。
- 2.5 分離與鑑別試驗
- 2.5.1 分離培養：將 2.4 節之增菌培養液混合均勻後，取 0.1 mL 置入稀釋液 9.9 mL 中，稀釋成 1：100 稀釋檢液(甲殼類動物、蛋及其他已有稀釋的增菌培養液，則直接由增菌培養液進行

劃線分離)，由未稀釋增菌培養液及 1:100 稀釋檢液，取兩接種環的菌量置於 A-H-B 或 mCCDA 培養基上，再劃線分離，每一增菌培養液至少做二重複。這些培養基應避光，並儘速置入厭氧容器中（儘可能裝半滿），於 42°C 微好氧培養 24-48 小時，每隔 24 小時觀察是否有菌落生長，檢測 *C. fetus* 時，則置於 37°C 微好氧培養 48-72 小時。

2.5.2 菌落鑑別與鏡檢：選擇性培養基上典型的曲狀桿菌菌落為圓形至不規則狀，具有平滑的邊緣，呈濃厚的半透明白色狀生長至呈薄膜似透明狀擴散生長。由前述具有可疑菌落的培養基上，每片鈎取 1 個可疑菌落，與滴在載玻片上的無菌生理食鹽水或緩衝溶液混合，作成薄抹片後蓋上蓋玻片，以暗視野顯微鏡的非油鏡(63 倍) 或位相差顯微鏡的油鏡(1,000 倍) 鏡檢。無上述設備，則依下述步驟製備薄抹片：鈎取 1 個可疑菌落，與對比染色液 0.1 mL 混合 3-5 分鐘後，以光學顯微鏡的油鏡(1,000 倍) 鏡檢，並與陽性對照菌株比較。曲狀桿菌呈現彎曲，長度 1.5-5 μm ，經常呈鋸齒般的鏈狀，長度不定。由培養基所挑出的菌株常以波動方式運動，而來自培養液者則以螺旋狀快速游動，不過有約 10% 菌株是完全不具運動性。較老或受傷的菌體運動性會減弱且呈球狀。當無法立即完成所有鑑別工作時，則應先將所有欲鑑別的培养基存放於 4°C。經過菌落鑑別和鏡檢後，有典型菌落，應分別接種於未含抗生素的 A-H-B 平板培養基或斜面培養基上，每個選擇性培養基鈎取兩個菌落，每個菌落接種一個平板培養基，置於 42°C 下，微好氧培養 24-48 小時(檢測 *C. fetus*，則置於 37°C 培養)。選擇雜菌污染最少的平板培養基，鈎取菌落進行生化試驗。有需要時，應再行純化。

2.5.3 初步試驗：自未含抗生素的 A-H-B 平板培養基或斜面培養基上鈎菌，進行革蘭氏染色 (Gram stain)、氧化酶試驗(oxidase test) 和觸酶試驗(catalase test)，結果為正反應者，則應進行 2.5.4 節的生化試驗。

2.5.3.1 革蘭氏染色

- (1) 鈎取適當菌量，與滴在載玻片上的無菌生理食鹽水混合，製成薄抹片，採自然風乾固定，勿用火烤。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘後，水洗，水洗時間應不超過 5 秒鐘。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘後，水洗。
- (4) 脫色：用 95% 乙醇洗至不再有紫色褪出時，再用水洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片之厚薄而定。
- (5) 複染：用複染液複染 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。曲狀桿菌為革蘭氏陰性。

2.5.3.2 氧化酶試驗

- (1) 將新鮮配製的氧化酶試劑直接滴於平板培養基或斜面培養基 24 小時培養的新鮮菌株上，在 10 秒鐘內，正反應的菌落起初會呈現粉紅色，然後漸漸地轉變為深紫藍色。由於試劑對菌株具毒性，欲保存菌株，應在滴入試劑後 3 分鐘內，完成菌株的移植。
- (2) 使用無菌鉑鉸接種針(避免使用鎳鉻製品)或牙籤或小木棒，自平板培養基或斜面培養基鈎取少量新鮮菌株，塗抹於氧化酶試劑潤濕之濾紙上，10 秒鐘內變為深紫藍色者為正反應，否則為負反應。

可選用(1)或(2)法進行試驗。曲狀桿菌為正反應。

2.5.3.3 觸酶試驗

自平板培養基或斜面培養基上鈎菌，塗抹於載玻片上，加 1 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。曲狀桿菌為正反應。

2.5.4 生化試驗

2.5.4.1 馬尿酸鹽水解試驗 (Hippurate hydrolysis test)

自未含抗生素的 A-H-B 平板培養基上鈎取一接種環菌量，置於 1% 馬尿酸鹽溶液 0.4 mL 中，混合均勻，在 37°C 水浴培養 2 小時後，加入水合茚三酮溶液 0.2 mL 搖勻後，再培養 10 分鐘，紫色(非淡紫色)者為正反應，否則為負反應。*C. jejuni* 和 *C. jejuni* subsp. *doylei* 為正反應。

2.5.4.2 乙酸吡啶酯水解試驗 (Indoxyl acetate hydrolysis test)

滴加 1 至 2 滴無菌蒸餾水，潤濕乙酸吡啶酯濾紙片後，自未含抗生素的 A-H-B 平板培養基鈎取稍多的菌量，塗抹於乙酸吡啶酯濾紙片上，在 20 分鐘內，呈現深藍色或藍綠色者為正反應，否則為負反應。

2.5.4.3 葡萄糖利用試驗 (Glucose utilization test)

自未含抗生素的 A-H-B 平板培養基上鈎菌，穿刺接種於兩支裝有 OF 培養基之試管中(一支含有葡萄糖，另一支則無，每支試管接種三次)，於 35-37°C 下微好氣培養 4 天。維持原色者為負反應。曲狀桿菌為負反應。

2.5.4.4 TSI 試驗 (TSI test)

自未含抗生素的A-H-B平板培養基上鉤菌，接種於TSI斜面上及穿刺其底部，在35-37°C下微好氣培養5天後，TSI底部呈黑色即為產生H₂S者為正反應，否則為負反應。

2.5.4.5 抗生素抑制試驗 (Antibiotic inhibition test)

自未含抗生素的A-H-B平板培養基上鉤菌，置於0.1%蛋白胨稀釋液5 mL中作成懸浮液後，將菌液濃度調整至1號麥克法蘭(McFarland No. 1)濁度標準。用無菌棉花棒沾取此濃度的懸浮液，在未含抗生素之A-H-B平板培養基表面均勻塗抹後，放置那利得酸(nalidixic acid)濾紙片和塞吩頭孢菌素(cephalothin)濾紙片於相對位置上，在37°C下微好氣培養24-48小時，濾紙片周圍有任何透明環即表示對抗生素具敏感性，否則具抗藥性。

2.5.4.6 生長溫度忍受性試驗(Growth temperature tolerance)

取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液一接種環，在3個未含抗生素的A-H-B平板培養基上分別劃一直線，每個培養基可接種4株菌(劃4條線)。3個培養基各自放置於25°C，35-37°C，42°C下微好氣培養3天，若培養基上有生長現象，即表示為正反應，否則為負反應。

2.5.4.7 馬康奇培養基生長試驗(Growth on MacConkey agar)

取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液一接種環，在馬康奇培養基上劃一直線，每個培養基可接種4株菌(劃4條線)，置於35°C下微好氣培養3天，培養基上有生長現象者為正反應，否則為負反應。曲狀桿菌為正反應。

2.5.4.8 1%甘胺酸生長試驗(Growth in 1% glycine)

吸取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液0.1 mL，接種於含有1%甘胺酸之生化鑑定用半固態改良培養基上，置於35-37°C下微好氣培養3天，培養基表面下有出現窄的生長環帶者為正反應，否則為負反應。曲狀桿菌為正反應。

2.5.4.9 3.5%氯化鈉生長試驗(Growth in 3.5%NaCl)

吸取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液0.1 mL，接種於含有3.5%氯化鈉之生化鑑定用半固態改良培養基上，置於35-37°C下微好氣培養3天，培養基表面下有出現窄的生長環帶者為正反應，否則為負反應。曲狀桿菌為負反應。

2.5.4.10 硫化氫生成試驗 (Production of H₂S from cysteine)

吸取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液0.1 mL，接種於含有0.02%半胱鹽酸之生化鑑定用半固態改良培養基上，然後將一張醋酸鉛濾紙條之一端懸掛於試管口，另一端置於管內(勿接觸到培養基)，於35-37°C下微好氣培養3天，醋酸鉛濾紙條呈黑色者為正反應，否則為負反應。曲狀桿菌為正反應。

2.5.4.11 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)

吸取2.5.4.5節已調好濃度的菌株懸浮液0.1 mL，接種於含有1%硝酸鉀之生化鑑定用半固態改良培養基上，於35-37°C下微好氣培養5天後，依序加入亞硝酸鹽試驗試劑A及B各0.1-0.5 mL，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色者為正反應，顏色無變化時，加入少許鋅粉而有紅紫色呈現者為負反應，否則亦為正反應。*C. jejuni*、*C. coli*、*C. lari*和*C. fetus* subsp. *fetus*等為正反應，*C. jejuni* subsp. *doylei*為負反應。

2.6 判定

下列菌(株)陽性者，應符合表列判定之結果

試 驗		<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C.</i> <i>hyointes-</i> <i>tinalis</i>	<i>C.</i> <i>upsalien-</i> <i>sis</i>
生長溫度 忍受性試驗	25°C	-	±	-	-	+	D	-
	35-37°C	+	+	+	+	+	+	+
	42°C	+	±	+	+	D	+	+
硝酸鹽還原試驗		+	-	+	+	+	+	+
3.5%氯化鈉生長試驗		-	-	-	-	-	-	-
觸酶試驗		+	+	+	+	+	+	-
氧化酶試驗		+	+	+	+	+	+	+
革蘭氏染色		陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)	陰性 (淡紅色)
馬康奇培養基生長試驗		+	+	+	+	+	+	-
運動性(鏡檢下)		+(81%)	+	+	+	+	+	+
1%甘胺酸生長試驗		+	+	+	+	+	+	+
馬尿酸鹽水解試驗		+	+	-	-	-	-	-
乙酸吡啶酯水解試驗		+	+	+	-	-	-	+
葡萄糖利用試驗		-	-	-	-	-	-	-

試 驗		<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C.</i> <i>hyointes-</i> <i>tinalis</i>	<i>C.</i> <i>upsalien-</i> <i>sis</i>
硫化氫生成試驗	醋酸鉛濾紙條	+	+	+	+	+	+	+
	TSI	-	-	D	-	-	+(c)	-
抗生素抑制試驗	那利得酸	S ^b	S	S	R	R	R	S
	塞吩頭孢菌素	R	R	R	R	S ^c	S	S

a 符號：+，90%或更多的菌株為正反應；-，90%或更多的菌株為負反應；D，11-89%的菌株為正反應；R，抗藥性；S，敏感性。

b. 抗那利得酸的 *C. jejuni* 曾被報導。

c. 抗塞吩頭孢菌素的 *C. fetus* subsp. *fetus* 曾被報導。

2.7 可參考使用國際間認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。

參考文獻：

- Butzler, J. P., and Oosterom, J. 1991. *Campylobacter* pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. 12:1-8.
- Hodge, D. S., Borczyk, A., and Wat, L.-L. 1990. Evaluation of the indoxyl acetate hydrolysis test for the differentiation of campylobacters. J. Clin. Microbiol. 28:1482-1483.
- Hunt, J. M., Abeyta, C., and Tran, T. 1998. Chapter 7. *Campylobacter*. In "Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual." 8th ed., pp.7.01-7.27. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- ISO 10272. 1995. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N. H., Ostroff, S. M. and Lassen, J. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. J. Clin. Microbiol. 30:3117-3121.
- Morris, G. K., and Patton, C. M. 1985. *Campylobacter*. pp. 302-308. In "Manual of Clinical Microbiology," 4th ed., E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler (Jr.), and H. J. Shadomy. (ed.), American Public Health Assoc., Washington, D.C.
- Nielsen, E. M., Engberg, J., and Madsen, M. 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish patients, poultry, cattle, and swine. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 19:47-56.
- Skirrow, M. B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. Br. Med. J. 2:9-11.
- Skirrow, M. B. 1990. Foodborne illness *Campylobacter*. The Lancet 336: 921-923.
- Smibert, R. M. 1984. Genus II. *Campylobacter*, pp. 111-118. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," Vol. 1. N. R. Krieg and J. G. Holt (eds). Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Stern, N. J., and Kazmi, S. U. 1989. *Campylobacter jejuni*. pp. 71-110. In "Foodborne Bacterial Pathogens", Ed. M. P. Doyle. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Stern, N. J., Patton, C. M., Doyle, M. P., Park, C. E., and McCardell, B. A. 1992. Chapter 29. *Campylobacter*. In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods." 3rd ed., pp. 475-495. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. (eds). American Public Health Association Inc., Washington, D. C., USA.
- Tauxe, R. V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. pp. 9-19. In "*Campylobacter jejuni* Current Status and Future Trends," Nachamkin I., Blaser M. J., and Tompkins L. S. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yuki, N., and T. Miyatake. 1998. Guillain-Barre syndrome and Miller-Fisher's syndrome following *Campylobacter jejuni* infection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 845:330-340.