

食品微生物之檢驗方法—曲狀桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Campylobacter* spp.

第一部：曲狀桿菌之分離

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：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養之定性方法。
 - 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. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
 - 2.2.5. 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g者，靈敏度為1 mg。
 - 2.2.6. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.7. 吸管或吸管尖：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。
 - 2.2.8. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
 - 2.2.9. 稀釋瓶：160 mL，玻璃、聚乙烯(polyethylene)、鐵弗龍(Teflon)或其他能耐 121°C 濕熱滅菌20分鐘以上之塑膠材質，附螺旋蓋。
 - 2.2.10. 培養皿：已滅菌，內徑約9 cm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。
 - 2.2.11. 增菌用容器：附螺旋蓋之50 mL、500 mL三角錐瓶或廣口瓶；玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐 121°C 濕熱滅菌20分鐘以上之塑膠材質；400 mL或3.5 L之無菌袋或過濾型無菌袋。
 - 2.2.12. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.13. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.14. 溫度計：量測溫度範圍 $1\sim 55^{\circ}\text{C}$ ，最小刻度 0.1°C 。
 - 2.2.15. 水浴：加蓋，具水流循環系統，能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.16. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金、鉑銱或鉻線材質，或可拋棄式者。
 - 2.2.17. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm，13 × 120 mm，15 × 150 mm，16 × 150 mm試管，或其他適用者。

- 2.2.18. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.19. 顯微鏡：能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡。
- 2.2.20. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 2.2.21. 研鉢、杵。
- 2.2.22. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌。
- 2.2.23. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.24. 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鋁盤，然後將鋁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。
- 2.2.25. 無菌濾膜：孔徑 0.45 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.26. 微孔濾器：可放置 2.2.25. 節無菌濾膜且應為無菌或可滅菌者。
- 2.2.27. 麥克法蘭濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)
- 2.2.28. 試藥：氯化鈉、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、氫氧化鈉、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、馬尿酸鈉(sodium hippurate)、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、葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘氨酸(glycine)、半胱氨酸鹽酸(cysteine-HCl)、碳酸鈉、檸檬酸鈉(sodium citrate)、硝酸鉀、磺胺酸(sulfanilic acid)、 α -萘酚(α -naphthol)、氯化氧化原血紅素(haemin)、去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)、鋅粉、硫酸銨亞鐵、硫酸亞鐵、偏亞硫酸氫鈉(sodium metabisulphite)、 α -酮麩胺酸(α -ketoglutaric acid)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、硫代硫酸鈉、沙黃 O (safranin O)、酚紅(phenol red)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、中性紅(Neutral red)、次氯酸鈉、頭孢匹拉肟鈉(sodium cefoperazone)、活性炭、乳酸三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim lactate)、三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)、萬古黴素

(vancomycin)、環己亞醯胺(cycloheximide)、立汎黴素(rifampicin)、節絲菌素 B (amphotericin B)、多黏桿菌素 B 硫酸鹽(polymyxin B)、乙酸吲哚酯(indoxyl acetate)、水合茚三酮(ninhydrin)、N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl)、那利得酸(nalidixic acid) (30 µg)濾紙片和塞吩頭孢菌素(cephalothin) (30 µg)濾紙片等均採用化學試藥級，肉蛋白胨(meat peptone)、乳白蛋白水解物(lactalbumin hydrolysate)、酵母抽出物(yeast extract)、溶胞馬血(lysed horse blood)、肉抽出物(meat extract)、蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptose)、酪蛋白水解物(casein hydrolysate)、牛胚胎血清(fetal bovine serum)、牛肉抽出物(beef extract)、胨蛋白胨(proteose peptone)、聚蛋白胨(polypeptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、3 號膽鹽(bile salts No.3)、2 號營養培養液(nutrient broth No.2)等均採用微生物級。

2.2.29. 試劑

2.2.29.1. 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。

2.2.29.2. 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。

2.2.29.3. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% peptone diluent)：取蛋白胨 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。

2.2.29.4. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)

2.2.29.4.1. 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 中。

溶液 B：取草酸銨 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。

2.2.29.4.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g，置於研钵中，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水中，將此溶液注入褐

色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研砵及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成 300 mL。

2.2.29.4.3. 哈克氏複染液(複染劑)：

取沙黃 O 2.5 g 溶於 95% 乙醇 100 mL 中，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，因此若購買成品時，要注意其保存期限，若自行配製者應檢查其染色效果。

2.2.29.5. 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。

2.2.29.6. 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。

2.2.29.7. 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。

2.2.29.8. 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 孔徑無菌濾膜之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°C。

2.2.29.9. 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。

2.2.29.10. 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。

2.2.29.11. 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。

2.2.29.12. 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。

2.2.29.13. 1 M 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 μm 孔徑無菌濾膜之微孔濾器進行無菌過濾。

2.2.29.14. 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。

2.2.29.15. 20% 乙酸吲哚酯(Indoxyl acetate)溶液

取乙酸吲哚酯 0.5 g 溶於裝有丙酮 2.5 mL 的褐色試藥瓶中，振動溶解。

2.2.29.16. 乙酸吲哚酯濾紙片

滴 20% 乙酸吲哚酯溶液 25 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 下儲存備用。

2.2.30. 培養基

2.2.30.1. 曲狀桿菌增菌培養液(*Campylobacter* enrichment broth)

a. 曲狀桿菌增菌培養液(*Campylobacter* enrichment base) (Bolton formula)

肉蛋白朊(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 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 -ketoglutamic 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 $^{\circ}\text{C}$ 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) 頭孢匹拉腓鈉(sodium cefoperazone)溶液

取頭孢匹拉腓鈉 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°C 可貯存 5 日，-20°C 可貯存 14 日，
-70°C 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°C 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 2.2.30.3.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。

2.2.30.2. 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

蛋白朊(peptone)..... 10 g
氯化鈉..... 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 μ m 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 $^{\circ}$ 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 μ m 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 滅菌 15 分鐘，冷卻備用，最終 pH 值為 7.4 \pm 0.2。使用前，加入 2.2.30.1.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 2.2.30.3.節之節絲菌素 B 溶液 10 mL 替代。

2.2.30.3. 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)

牛心 500 g 之浸出物(beef heart, infusion from 500 g) . 10g
胰化蛋白朊(tryptose)..... 10 g
氯化鈉..... 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 μ m 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 $^{\circ}$ 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 °C 貯存者限 1 個月內使用，在 -70 °C 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 °C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50 °C，加入 2.2.30.1. 節之無菌溶胞馬血 50 mL 和頭孢匹拉脞鈉溶液 6.4 mL，2.2.30.2. 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 °C 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。

2.2.30.4. 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
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 °C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50 °C，加入 2.2.30.1. 節之頭孢匹拉脞鈉溶液 6.4 mL，2.2.30.3. 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 °C 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。

2.2.30.5. 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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50°C，加入 2.2.30.1.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。

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

曲狀桿菌增菌培養液(*Campylobacter* enrichment base)(Bolton formula) 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氨酸(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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。

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

曲狀桿菌增菌培養液(*Campylobacter* enrichment base)(Bolton formula) 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°C 滅菌 15 分鐘。貯存時，拴緊螺旋蓋。

2.2.30.8. 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 1 mL
(fetal bovine serum)

已滅菌 10% 甘油(glycerol) 1 mL
混合均勻後使用。

2.2.30.9. 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
蛋白胨(peptone)	15 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	5 g
氯化鈉	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：

聚蛋白胨(polypeptone)	20 g
氯化鈉	5 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 g
硫酸銨亞鐵(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。

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

胰化蛋白胨(tryptone)	2 g
氯化鈉	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。

2.2.30.11. 馬康奇培養基(MacConkey agar)

胰蛋白胨(protose peptone)	3 g
蛋白胨(peptone)	17 g
乳糖(lactose).....	10 g
3 號膽鹽(bile salts No.3).....	10 g
氯化鈉.....	1.5 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。

2.3. 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 2 N 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 16000 × 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 1 M 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 1000 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 $20000 \times g$ 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 $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ 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(1000 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(1000 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養基存放於 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，再以水洗。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，然後漸漸地轉變成深紫藍色。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) 使用無菌鉑鉍接種針(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，加入水合茛三酮溶液 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. 乙酸吲哚酯水解試驗(Indoxyl acetate hydrolysis test)

滴加 1 至 2 滴無菌蒸餾水，潤濕乙酸吲哚酯濾紙片後，自未含抗生素的 A-H-B 平板培養基鈎取稍多的菌量，塗抹於乙酸吲哚酯濾紙片上，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 平板培養基上鈎菌，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 平板培養基上鈎菌，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^a

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		—	—	—	—	—	—	—
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. 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。

第二部：曲狀桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於曲狀桿菌之鑑別。
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) 進行鑑別之方法。
 - 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。
 - 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°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. 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 抽取用：適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組。
 - 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. *Campylobacter* spp. (標的基因：16s gene)

引子 F：5'-CACGTGCTACAATGGCATAT-3'

引子 R：5'-GGCTTCATGCTCTCGAGTT-3'

探針 P：5'-(FAM)-CAGAGAACAATCCGAACCTGGGACA
-(MGB)-3'

PCR 增幅產物大小 108 bp

2.3.2.1.2. *Campylobacter jejuni* (標的基因：*ceuE* gene)

引子 F：5'-TGGAATTTTAGATACTTTTGATGCT-3'

引子 R：5'-GGTTTGTTTTAAATTGTTGTAGGT-3'

探針 P：5'-FAM-AGCAGGAACGCCAACGACTT-
BHQ1-3'

PCR 增幅產物大小 102 bp

2.3.2.1.3. *Campylobacter coli* (標的基因：*ceuE* gene)

引子 F：5'-ATGCCCTAAGACTTAACGATA-3'

引子 R：5'-GCTTGTCTTTAAATTGCTGTAAG-3'

探針 P：5'-FAM-AGTTGCAGGAGTTCCAGCTAAAAAC
TTG-BHQ1-3'

PCR 增幅產物大小 81 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°C 貯存備用，另探針需避光保存，探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)或 Minor Groove Binder (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：曲狀桿菌參考菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 及 1000 μL。

- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.3. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μ L。
- 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 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 μ M 引子 F.....	2.0 μ L
5 μ M 引子 R.....	2.0 μ L
5 μ M 探針.....	1.5 μ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 μ L
檢體 DNA 溶液.....	5.0 μ L
無菌去離子水.....	2.0 μ L
總體積.....	25.0 μ L

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 2.3.1.節於 35°C 培養 18~24 小時之檢液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，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，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，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°C 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陰性細菌 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°C 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，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，置於 -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/ μL 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 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 $200 \times g$ 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. 曲狀桿菌菌種鑑別基因反應條件

步驟	溫度($^{\circ}\text{C}$)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	15
3. 黏接、延展	60	30

步驟 2 至步驟 3，共進行 40 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 與曲狀桿菌之正反應對照組之 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曲狀桿菌。

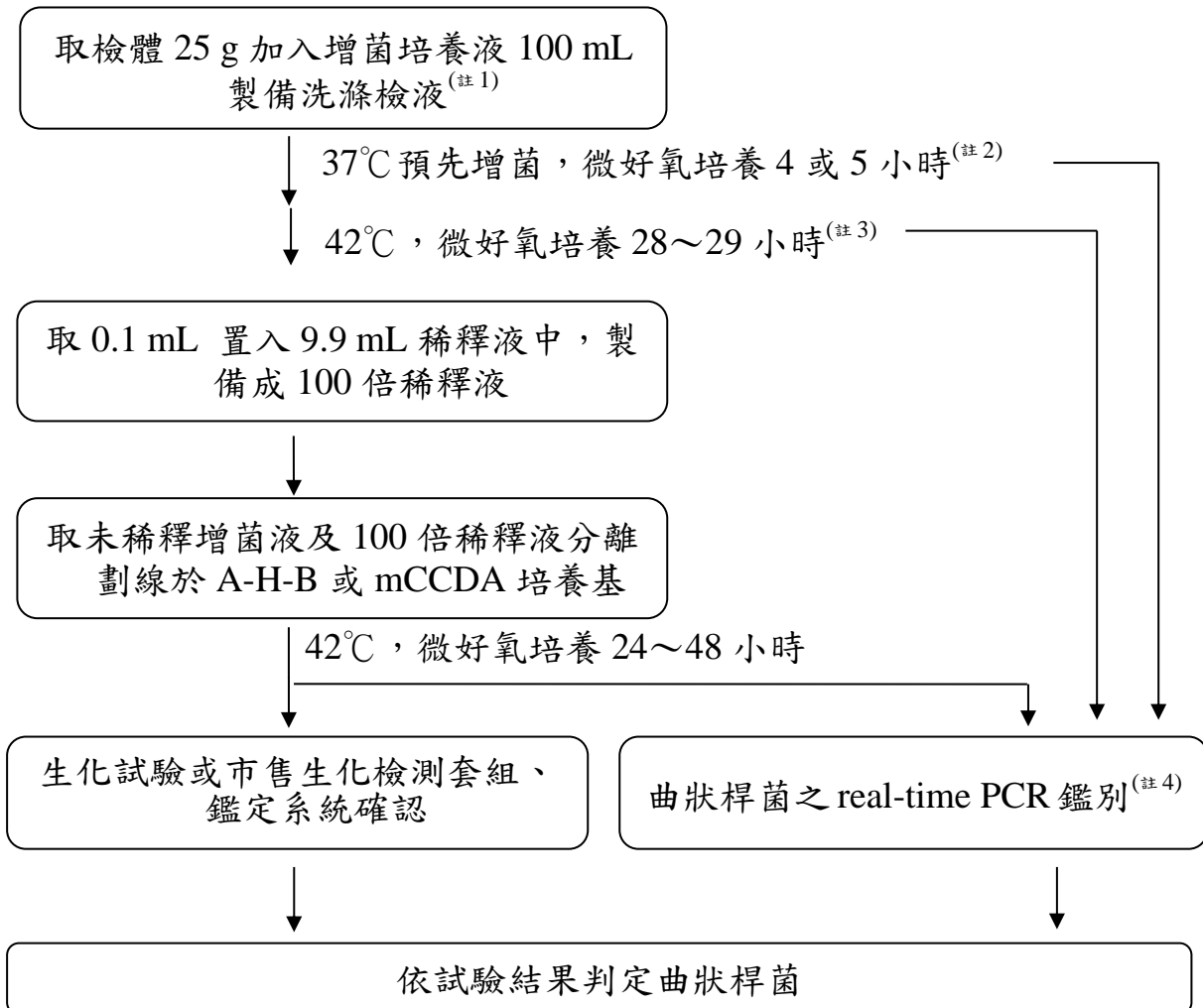
註 5：本 Real-time PCR 反應條件係採 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部曲狀桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

參考文獻

1. Hunt, J. M., Abeyta, C. and Tran, T. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 7 *Campylobacter*. US FDA.
2. USFDA. 2011. FDA Revised *Campylobacter* Detection Method from Food Samples.
3. Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K. and Madsen, M. 2004. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42: 5125–5132.

檢驗流程圖



註 1：針對不同檢體參照第一部分 2.3.節進行檢體之處理。

註 2：4 小時預先增菌培養為針對乳製品、生產後十天或已遭污染產品。
5 小時預先增菌培養針對水檢體、甲殼類動物或經冷凍冷藏存放超過 10 天檢體。

註 3：參照第一部分 2.4.3.節調整培養時間及溫度。

註 4：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。