

食品微生物之檢驗方法—曲狀桿菌之檢驗修正草案總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「食品微生物之檢驗方法—曲狀桿菌之檢驗」修正草案，其修正要點如下：

- 一、修正英文標題。
- 二、增列第一部第二節檢驗方法之說明。
- 三、第一部器具及材料增列生物安全操作櫃、稀釋瓶、增菌用容器及溫度計，另修正天平、試管及無菌濾膜。
- 四、第一部試藥增列部分化學試藥之英文名稱及微生物級試藥。
- 五、修正 2.2.29.4.3.節「複染液(複染劑)」之配製。
- 六、增列第二部：曲狀桿菌之 real-time PCR 檢測。
- 七、增列參考文獻及檢驗流程圖。

食品微生物之檢驗方法—曲狀桿菌之檢驗修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
Methods of Test for Food Microorganisms - Test of <i>Campylobacter</i> spp. <u>第一部：曲狀桿菌之分離</u> 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：<u>檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養之定性方法。</u> 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<u>以上</u>，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： <u>2.2.1. 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</u> 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±3℃ 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℃ 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 及 500 mL 三角錐瓶或廣口瓶；玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐 121℃ 濕熱滅菌 20 分鐘以上之塑膠材質；	Methods of Test for Food <u>Microbiology</u> - Test of <i>Campylobacter</i> spp. 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<u>約</u>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℃ 者。 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)：<u>能</u>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 之無菌袋或過濾行無菌袋；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	一、修正英文標題。 二、增列第一部第二節檢驗方法之說明。 三、第一部器具及材料增列生物安全操作櫃、稀釋瓶、增菌用容器及溫度計，另修正天平、試管及無菌濾膜。 四、第一部試藥增列部分化學試藥之英文名稱及微生物級試藥。 五、修正 2.2.29.4.3. 節「複染液(複染劑)」之配製。 六、增列第二部：曲狀桿菌之 real-time PCR 檢測。 七、增列參考文獻及檢驗流程圖。 八、增修訂部分文字。

400 mL 或 3.5 L 之無菌袋或過濾行無菌袋。 2.2.12. <u>酸鹼度測定儀(pH meter)</u>。 2.2.13. <u>培養箱</u>：能維持內部溫度溫差在$\pm 1^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.14. <u>溫度計</u>：量測溫度範圍 $1\sim 55^{\circ}\text{C}$，最小刻度 0.1°C。 2.2.15. <u>水浴</u>：<u>加蓋</u>，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. <u>接種針及接種環</u>(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金、鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.17. <u>試管</u>：<u>$10 \times 100\text{ mm}$</u>，<u>$13 \times 100\text{ mm}$</u>，<u>$13 \times 120\text{ mm}$</u>，<u>$15 \times 150\text{ mm}$</u>，<u>$16 \times 150\text{ mm}$</u> 試管，或其他適用者。 2.2.18. <u>旋渦混合器(Vortex mixer)</u>。 2.2.19. <u>顯微鏡</u>：<u>能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡</u>。 2.2.20. <u>載玻片及蓋玻片</u>：適用於染色及鏡檢用。 2.2.21. <u>研鉢、杵</u>。 2.2.22. <u>藥勺、剪刀、小刀、鑷子</u>：可滅菌。 2.2.23. <u>濾紙及褐色試藥瓶</u>。 2.2.24. <u>厭氧容器 (Anaerobe container)</u>：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% O_2, 10% CO_2, 85% N_2)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	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。 2.2.12 <u>接種針及接種環</u>(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金、鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.13 <u>試管</u>：<u>$15 \times 150\text{ mm}$ 試管</u>或其它適用者。 2.2.14 <u>無菌濾膜</u>：孔徑 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 及 $0.45\text{ }\mu\text{m}$，直徑 25 mm、47 mm、$\geq 90\text{ mm}$ 之親水性醋酸纖維濾膜。 2.2.15 <u>微孔濾器</u>：可放置 2.2.14 節無菌濾膜且應為無菌或可滅菌者。 2.2.16 <u>光源</u>：一般日光燈。 2.2.17 <u>天平</u>：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 <u>加熱板(Hot plate)</u>：具有磁性攪拌功能者。 2.2.20 <u>pH 測定儀</u>。 2.2.21 <u>pH 試紙</u>：pH 值範圍 6-8。 2.2.22 <u>回轉式振盪器</u>：可達 25 rpm 者。 2.2.23 <u>旋渦混合器(Vortex mixer)</u>。 2.2.24 <u>顯微鏡</u>：<u>接物鏡 100 倍之位相差顯微鏡(phase-contrast microscope)</u>或<u>接物鏡 63 倍之暗視野顯微鏡(dark-field microscope)</u>或<u>接物鏡 1,000 倍之光學顯微鏡(light microscope)</u>。	
---	--	--

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 0.22 μm 及 0.45 μm，直徑 25 mm、47 mm、≥ 90 mm 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(<u>crystal violet</u>)、草酸銨(<u>ammonium oxalate</u>)、馬尿酸鈉(<u>sodium hippurate</u>)、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、甘胺酸 (<u>glycine</u>)、半胱胺酸鹽酸 (<u>cysteine-HCl</u>)、碳酸鈉、檸檬酸鈉 (<u>sodium citrate</u>)、硝酸鉀、磺胺酸 (<u>sulfanilic acid</u>)、α-萘酚(<u>α-naphthol</u>)、氯化氧化原血紅素(haemin)、去氧膽酸鈉 (<u>sodium desoxycholate</u>)、鋅粉、硫酸銨亞鐵、硫酸亞鐵、偏亞硫酸氫鈉(<u>sodium metabisulphite</u>)、α-酮麩胺酸(<u>α-ketoglutamic acid</u>)、丙酮酸鈉 (<u>sodium pyruvate</u>)、硫代硫酸鈉、沙黃 O (<u>safranin O</u>)、酚紅(<u>phenol red</u>)、溴麝香草藍(<u>bromthymol blue</u>)、中性紅 (<u>Neutral red</u>)、次氯酸鈉、頭孢匹拉肟鈉(<u>sodium cefoperazone</u>)、活性炭、乳酸三甲氧苄胺嘧啶 (<u>trimethoprim lactate</u>)、三甲氧苄胺嘧啶 (<u>trimethoprim</u>)、萬古黴素 (<u>vancomycin</u>)、環己亞醯胺 (<u>cycloheximide</u>)、立汎黴素 (<u>rifampicin</u>)、節絲菌素 B (<u>amphotericin B</u>)、多黏桿菌素 B 硫酸鹽(<u>polymyxin B</u>)、乙酸吲哚酯(<u>indoxyl acetate</u>)、水合茚三酮(<u>ninhydrin</u>)、N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽 (<u>N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenedia</u>	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 英吋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、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、乙酸吲哚酯、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，蛋白腴、聚蛋白腴、卵白蛋白、胰化蛋白腴、胰化蛋白腴、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。
--	--

mine·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 (tryptone)、酪蛋白水解物 (casein hydrolysate)、牛胚胎血清 (fetal bovine serum)、牛肉抽出物 (beef extract)、肝蛋白胨 (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℃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℃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℃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℃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

2.2.31 培養基

2.2.31.1 曲狀桿菌增菌培養液 (Campylobacter enrichment broth)

a. 曲狀桿菌增菌培養液

(Campylobacter enrichment base)

(Bolton formula)

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-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℃ 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

時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。 <u>2.2.29.4.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：</u> 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钵及杵後，併入洗液，加蒸餾水使成 300 mL。 <u>2.2.29.4.3. 哈克氏複染液(複染劑)：</u> 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。 <u>2.2.29.5. 0.2% 中性紅溶液(Neutral red solution)</u> 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。 <u>2.2.29.6. 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite detection reagents)</u> 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。 <u>2.2.29.7. 3% 過氧化氫溶液(Hydrogen peroxide solution)</u> 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。 <u>2.2.29.8. 1% 馬尿酸鹽溶液(Hippurate solution)</u> 取馬尿酸鈉(sodium hippurate) 0.1 g 溶於蒸餾水 10 mL 中，以具有 0.22 μm 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。 <u>2.2.29.9. 水合茚三酮溶液(Ninhydrin solution)</u> 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	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°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 2.2.31.3 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
---	--

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。

2.2.29.16. 乙酸吡啶酯濾紙片

滴 20%乙酸吡啶酯溶液 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°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	5 g
氯化氧化原血紅素	0.01 g

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
蛋白胨(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。

(haemin)	
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°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 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 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 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 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。

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)	10 g
胰化蛋白胨(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 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°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 μ m 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 $\pm$ 0.2。冷卻至約 50°C，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°C 培養箱中數小

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 $\pm$ 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
蛋白胨(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 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)

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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 $\pm$ 0.2。冷卻至約 50°C，加入 2.2.31.1 節之頭孢匹拉肅鈉溶液 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°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。2.2.31.5 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°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 $\pm$ 0.2。冷卻至約 50°C，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

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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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)	40 g
牛心 500 g 之浸出物 (beef heart, infusion from 500 g)	10 g
胰化蛋白胨(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 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 $^{\circ}\text{C}$ 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，

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 $^{\circ}\text{C}$ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 $\pm$ 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 $\pm$ 0.2，分取 10 mL 注入螺旋蓋試管中，以 121 $^{\circ}\text{C}$ 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
---------------------	-----

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 和頭孢匹拉肟鈉溶液 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.節之頭孢匹拉肟鈉溶液 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~

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	15 g
胰蛋白胨(pancreatic 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：

聚蛋白胨(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)

胰化蛋白胨(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

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。

2.2.30.5. 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℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。冷卻至約 50℃，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 (<u>Campylobacter enrichment base</u>) (<u>Bolton formula</u>)	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。

2.2.30.7. 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 (<u>Campylobacter enrichment base</u>) (<u>Bolton formula</u>)	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，

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℃ 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)

胨蛋白 (proteose peptone)	3 g
蛋白胨 (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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 滅菌 15 分鐘。

2.2.32.3 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℃ 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

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。
2.2.30.8.

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(fetal bovine serum)	1 mL
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
胰蛋白胨(protease 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℃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
硫酸亞鐵(ferrous sulphate)	0.2 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	0.2 g

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钵及杵後，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 μm 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℃。

2.2.32.9 水合茚三酮溶液(Ninhydrin

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℃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	1000mL

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

溶液(solution)	取水合茛三酮 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 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。
2.2.32.14 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。
2.2.32.16 乙酸吡啶酯濾紙片	滴 20%乙酸吡啶酯溶液 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℃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

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 $16000 \times g$ 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

(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 $16000 \times g$ 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

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

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

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℃ 下 18 小時內或 45℃ 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℃ 下 18 小時內或 45℃ 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℃，微好氧培養 4 小時。	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℃ 下 18 小時內或 45℃ 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℃ 下 18 小時內或 45℃ 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℃，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℃，微好氧培養 3 小時，再以 37℃，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℃(檢測 <i>C. fetus</i>，則繼續在 37℃ 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 <i>C. fetus</i>，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℃ 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 <i>C. fetus</i> 時，則置於 37℃ 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，每片鉤取 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：鉤取 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	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℃，微好氧培養 3 小時，再以 37℃，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℃(檢測 <i>C. fetus</i>，則繼續在 37℃ 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 <i>C. fetus</i>，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℃ 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 <i>C. fetus</i> 時，則置於 37℃ 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，每片鉤取 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：鉤取 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養基存放於 4℃。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℃ 下，微好氧培養 24~48 小時(檢測 *C. fetus*，則置於 37℃ 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

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℃。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℃ 下，微好氧培養 24~48 小時(檢測 *C. fetus*，則置於 37℃ 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

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℃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。<i>C. jejuni</i> 和 <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 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℃下微好氣培養 4 天。維持原色者為	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℃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。<i>C. jejuni</i> 和 <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 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℃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。	
---	---	--

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℃ 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℃ 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℃，35~37℃，42℃ 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℃ 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℃ 下微好氣培養 3 天，培養	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℃ 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℃ 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℃，35~37℃，42℃ 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℃ 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℃ 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	
---	--	--

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℃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℃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℃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。<i>C. jejuni</i>、<i>C. coli</i>、<i>C. lari</i> 和 <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 等為正反應，<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 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 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	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℃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℃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℃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。<i>C. jejuni</i>，<i>C. coli</i>、<i>C. lari</i> 和 <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 等為正反應，<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 為負反應。 2.5 判定 下列菌株陽性者，應符合表列判定之結果^a 2.6 可參考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，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。	
---	--	--

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℃ 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℃) 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. <i>Campylobacter</i> spp. (標的基因：16s gene) 引子 F： <u>5'-CACGTGCTACAATGGCATAT-3'</u> 引子 R： <u>5'-GGCTTCATGCTCTCGAGTT-3'</u> 探針 P： <u>5'-(FAM)-CAGAGAACAATCCGAAC</u> <u>TGGGACA-(MGB)- 3'</u> PCR 增幅產物大小 108 bp 2.3.2.1.2. <i>Campylobacter jejuni</i> (標的基因：ceuE gene) 引子 F： <u>5'-TGGAATTTTAGATACTTTTGATG</u> <u>CT-3'</u> 引子 R： <u>5'-GGTTTGTTTTTAAATTGTTGTAG</u> <u>GT-3'</u> 探針 P： <u>5'-FAM-AGCAGGAACGCCAACGAC</u> <u>TT- BHQ1-3'</u> PCR 增幅產物大小 102 bp 2.3.2.1.3. <i>Campylobacter coli</i> (標的基因：ceuE gene) 引子 F： <u>5'-ATGCCCTAAGACTTAACGATA-3'</u> 引子 R： <u>5'-GCTTGTCTTTAAATTGCTGTAAG</u> <u>-3'</u> 探針 P： <u>5'-FAM-AGTTGCAGGAGTTCCAGC</u> <u>TAAAACTTG-BHQ1-3'</u> 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℃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 μ L、10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。

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	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	15 sec
3. 黏接、延展	60°C	30 sec

步驟 2 至步驟 3，共進行 40 個循環反應。

2.7.1. 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。

2.7.2. 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.

2.6. 判定

下列菌株陽性者，應符合表列判定之結果^a

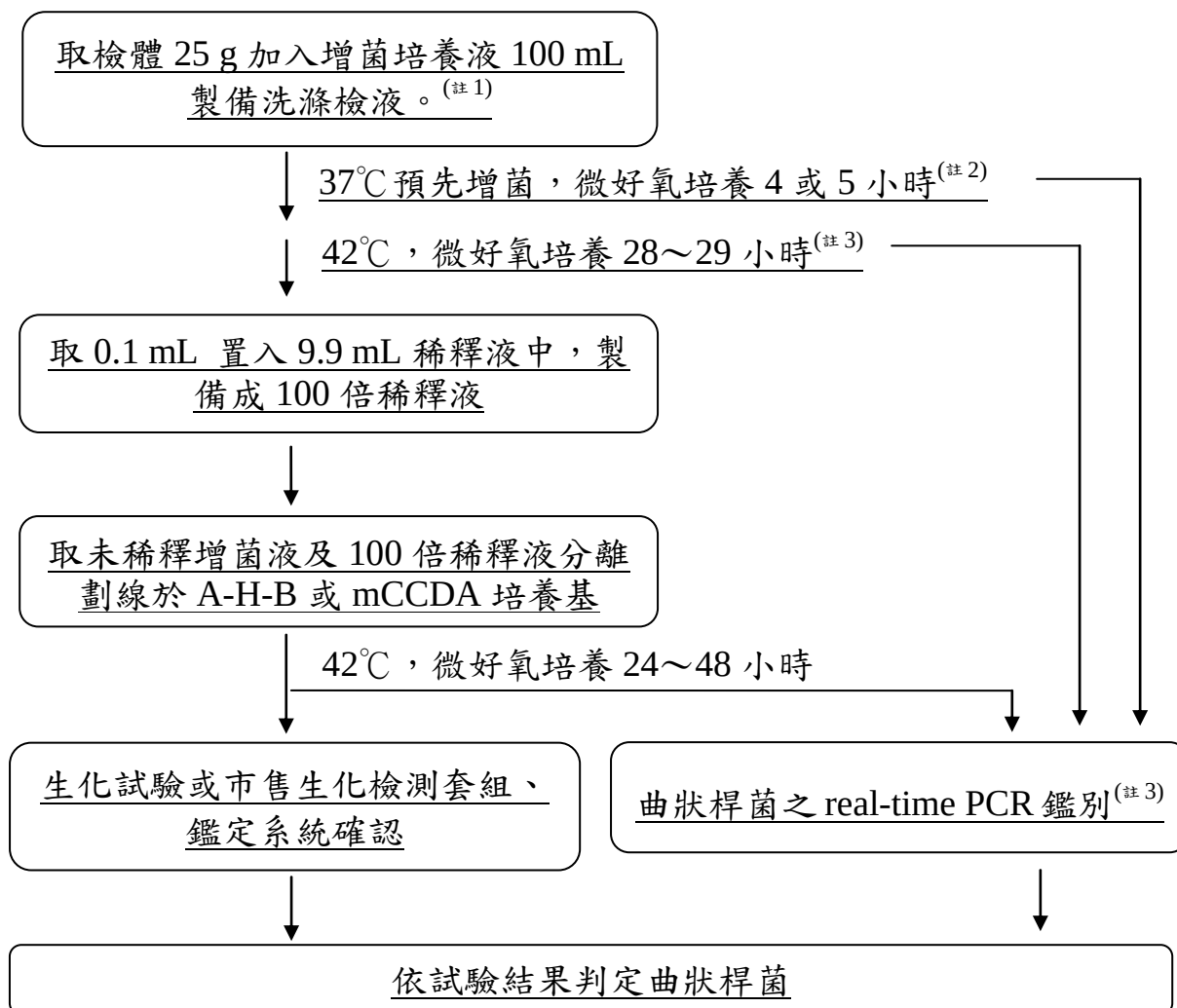
試 驗		<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C.</i> <i>hyointes-</i> <i>tinalis</i>	<i>C.</i> <i>upsalien-</i> <i>sis</i>
生長溫度 忍受性試 驗	25°C	—	±	—	—	+	D	—
	35-37°C	+	+	+	+	+	+	+
	42°C	+	±	+	+	D	+	+
硝酸鹽還原試驗		+	—	+	+	+	+	+
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。

檢驗流程圖



註1：參照第一部分 2.3.節檢體之處理針對不同檢體。

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：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。