

計畫編號：DOH93-DC-2016

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

建立曲狀桿菌之參考實驗室

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：李智隆

研究人員：李智隆、周振英、楊季融、邱秀櫻、蔡金來

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目次	頁碼
封面	1
目錄	2
摘要	3
前言	4-8
材料與方法	8-12
結果	12-13
討論	14-16
結論與建議	17
參考文獻	17-20
圖、表	21-26

摘要

曲狀桿菌 (*Campylobacter*)在世界各地為相當普遍引發腹瀉之腸道致病菌，在已開發國家中，疾病以小於五歲幼兒及青少年之發生率為最高，估計在美國，每年約有數百萬人受影響，500 多人死亡。美國 CDC 的統計數據也指出曲狀桿菌為所有腹瀉症感染源的第一位，佔 38%，第二為沙門氏菌 (*Salmonella*)的 35%，第三為志賀桿菌 (*Shigella*)的 19%，第四為大腸桿菌 (*Escherichia coli*)的 5.5%；在開發中國家，曲狀桿菌大部份之病例不是未被診斷出來，就是沒有通報，通報率也較沙門和志賀菌為低。民國八十八年衛生署所公布之傳染病防治法，未將曲狀桿菌感染症列入。目前國內雖有少數醫學中心或研究單位已進行曲狀桿菌之檢驗，但其係針對醫療之目的而來，相對地，菌種之鑑定與分類或流行病學之分型較缺乏像國外有長期之分析與觀察。

本研究計劃在建立參考實驗室時首先從建立曲狀桿菌的檢驗方法著手，參考美國 CDC 之標準規範並加以改良，找出最適合菌體培養之材料與環境，並藉由各醫療院所提供之腹瀉患者臨床檢體來分離受曲狀桿菌感染患者之菌株以供日後各流病與研究資料之所需。總計由 92 年 12 月至 93 年 12 月一共從約 860 件不同地區的小兒腹瀉檢體中分離出 66 株曲狀桿菌，分離率約為 7.7%，經鑑定後包含 62 株 (93.9%)空腸曲狀桿菌 (*C. jejuni*)與 4 株 (6.1%)大腸曲狀桿菌 (*C. coli*)。受感染患者的年齡者要以小於 10 歲

(86.4%)的小孩為主，往往會伴隨著腹瀉與發燒症狀。除此之外，本計劃也成功將 PCR 之方法加入常規檢驗之流程，作為輔助鑑定與快速診斷之用。

前言

民國 92 年 12 月 8 日，衛生署疾病管制局由五歲多的小兒腹瀉病患的肛門拭子檢體中分離出首例空腸曲狀桿菌 (*Campylobacter jejuni*)。之後又陸續從不同地區之小兒腹瀉病患肛門拭子檢體中找出 65 件 (至 93 年 12 月 27 日止) 曲狀桿菌感染陽性的案例。其中更在同一天所檢驗的 8 件小兒腹瀉患者檢體中找出 3 件曲狀桿菌感染陽性的案件，比率高達 37.5%。此一發現又重新喚起了衛生單位對於曲狀桿菌感染症的重視。

曲狀桿菌是全世界最常造成細菌性腸胃炎案例的人類致病菌之一，它常引起已開發國家普遍性的感染 [1]。以美國在 2000 年的統計數據，約有 2 百萬人受感染，平均每 10 萬人中約有 20 個案件 (佔總人口數的 1%) [2]，500 多人死亡，其中以小於五歲幼兒及 15 至 44 歲的成年人之發生率為最高，且感染率有逐年增加的趨勢，同年於美國 CDC 的統計數據，在 12,373 個由細菌引發的腸道傳染病案例當中，曲狀桿菌感染為第一位，佔 38% (4,713/12,373)，第二為沙門氏菌 (*Salmonella*) 的 35% (4,330/12,373)，第三為志賀桿菌 (*Shigella*) 的 19% (2,355/12,373)，第四為大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的 5.5% (683/12,373) [3]；北歐諸國曲狀桿菌的感染則為每 10 萬人中有

約 60~90 個案件。開發中國家的感染趨勢稍有不同，成人感染的通報案例較少，根據東南亞各國家的統計數據，患者以小於二歲幼兒及嬰兒為主，而且通常會與其它腸內致病菌如大腸桿菌、沙門氏菌或志賀菌等共同感染，通報率也較後兩者為低。此外它也是引發開發中國家旅行者腹瀉症 (travelers' diarrhea) 之重要致病菌。

其實曲狀桿菌早在百年前就已被發現。1886 年 Escherich 在腹瀉小兒的糞便檢體中觀察到型態類似曲狀的桿菌。1913 年 McFaydean 和 Stockman 從流產的胎羊組織當中確認曲狀桿菌 (*Campylobacter*；當時稱作 related *Vibrio*) 的存在。1957 年 King 由腹瀉小兒的血液檢體分離出 related *Vibrio*。1972 年北京的微生物學家首先由腹瀉病人的糞便檢體中分離出曲狀桿菌 (*Campylobacter*) [3]。隨著當時曲狀桿菌選擇性培養基的發展，許多實驗室紛紛用它培養腹瀉患者的糞便檢體來檢測此菌的存在，很快的曲狀桿菌逐漸成為常見的人類致病菌。

由曲狀桿菌引起的人類腸胃炎，患者會出現程度不同的症狀諸如腹瀉 (小兒通常會帶血)、腹痛、噁心、嘔吐、不適、發燒等，在液狀之糞便中會有黏液和白血球，有時會有與傷寒類似的症狀出現。此病通常會持續 2-5 天，以小於五歲的孩童或是免疫機能較差的老年人的症狀較為明顯，成人的感染有時會拖很長，亦會復發 [3]。感染較盛行的季節在已開發國家以夏

季和早秋為主；開發中國家由於缺乏對此菌完整的評估，感染較無季節性。感染的原因大多與食入未煮熟的食物有關，尤其是未煮熟的雞肉、未經巴斯特殺菌之牛奶等，前者常造成偶發性感染，後者則常與大流行有關。在開發中國家，除了人類之外，曲狀桿菌也會引起各種動物包括家禽、綿羊、豬、狗、貓等的疾病，其中又以家禽類的感染案例最多，其主因為家禽類的體溫最接近適合它生長的 42°C。由於目前已發現從人與雞分離出來的曲狀桿菌的生物與血清型皆具相關性，顯示雞是開發中國家人類感染曲狀桿菌的一個重要來源，人與人間之傳染反較不常發生。曲狀桿菌屬共有 14 個菌種，其中最常引起人類腸胃道感染案例的，以 *C. jejuni* 佔絕大多數 (98% 以上) [4]，其次為 *C. coli* (約 1% 左右)，*C. fetus* 在極少數的案例會引起患者全身性的菌血症。至於其它種之曲狀桿菌所引起的人類疾病目前仍未明確的定義出來。

曲狀桿菌對人類的感染力主要與患者的健康情形、年齡、免疫機能以及感染人體的菌量等有關，目前認為可能的致病決定因子包括：(1) 與鞭毛有關的運動性。它是目前被認為最重要的因子。(2) 菌體在小腸黏膜的附著。曲狀桿菌的外膜蛋白已知會參與菌體在腸道寄生的過程。(3) 毒素的產生。目前已知 Cytolethal distending toxin (CDT) 毒素會造成細胞的膨脹，並且阻礙細胞週期的進行，最後導致細胞的死亡。除了上述三大項目之外，

某些曲狀桿菌的質體也都有與其致病力有關的報導 [5]。

民國八十八年衛生署所公布之傳染病防治法，未將曲狀桿菌感染症列入，因此多年來國內對此菌之檢驗與監視等疫情報導上，勘稱未有完善之整合，這也是許多開發中國家的一大問題。目前國內雖有少數醫學中心或研究單位已進行曲狀桿菌之檢驗，但其係針對醫療之目的而來，相對地，菌種之鑑定與分類或流行病學之分型較缺乏像國外有長期之分析與觀察。不僅如此，對於它的分離主要是利用選擇性培養基的直接接種，但由於其中所含有的抗生素可能會抑制某些較挑剔的曲狀桿菌例如 *C. upsaliensis* 及 *C. fetus* 等等的生長，再加上它本身對於外在環境較為敏感，檢體的運送過程若不恰當，可能會造成該菌的死亡，而臨床上常用的 42°C 培養環境也往往無法提供某些嗜熱性菌種適當的生長，導致目前曲狀桿菌的分離率普遍均偏低，很多由它所引起之腸胃炎未被確認，於是通報率也跟著偏低。由相關研究報告顯示 [6]，台灣地區 1996 年由 6540 位腹瀉患者的臨床檢體中，分離出 162 株曲狀桿菌被，分離率僅為 2.5%，其中以小於五歲的小兒患者最多，這與歐美等已開發國家的數據有相當的出入。因此國內衛生主管機構應建立一個曲狀桿菌專屬之研究與參考檢驗室，以結合國內醫學中心與基層衛生單位之需求，進而傳遞與交換流行病學之訊息，期望掌握此疾病在國內發生之趨勢與動態。

衛生署疾病管制局建立此菌參考實驗室的主要目的，是從各方面著手包括檢體如何運送、最適培養基的選擇以及培養環境的評估等等，希望能夠改善目前曲狀桿菌分離率偏低的情況，另外也加入一些新的分子診斷技術如 PCR 等，作為有效且快速的輔助鑑定工具，希望能夠將臨床診斷的時間由現在的 4~5 天做最有效的縮短，以提昇目前對於曲狀桿菌的檢驗效率。除此之外，未來更可利用更多菌種型別區分技術將國內感染的趨勢作一完整的評估，期望能夠在防疫的角度上，對此菌的流行病學狀況有新的瞭解。

材料與方法

參考美國 CDC 對於曲狀桿菌的檢驗方法，本研究將之做些許的改良，定出一套標準的流程。

(一)檢體採集：

檢體採集的對象以小兒急性腹痛或腹瀉者、各醫療院所或定點醫師之可疑患者及基層衛生局所送驗之檢體為主。檢體的選擇為肛門拭子，採取時應盡量採到少許糞便或是黏液，並將採集後的棉棒保存在輸送培養基 Cary-Blair 中，試管要確保密封，並在 4°C 的環境下盡速運送至實驗室。

(二)培養基的選擇：

目前美國 CDC 建議常規使用的選擇性培養基為 mCCDA (modified cefoperazone charcoal deoxycholate agar)以及 CSM (charcoal-containing selective medium)兩種。由於大氣中的氧濃度可能會對曲狀桿菌造成傷害，經測試後發現含有氧氣阻絕劑如 sodium pyruvate (250 mg/l)、sodium metabisulphite (250 mg/l)、ferrous sulphate (250 mg/l)等成分的 mCCDA 培養基可以使曲狀桿菌的菌落較大，型態較易辨識，生長速率也較快，因此本研究之後皆以使用 mCCDA 培養基為主。

(三)檢體接種：

將棉棒檢體直接接種在曲狀桿菌的選擇性培養基 mCCDA 中，以四區劃線劃開，置於 42°C 微氧的環境 (5% 氧氣、10% 二氧化碳、85% 氮氣，使用 BBL 之 CampyPak 產氣包)中培養 48 小時後觀察結果。若檢體為患者的糞便，則需先懸浮在少許適用於曲狀桿菌的液體培養基 (*Campylobacter* enrichment broth)再進行接種。

(四)結果判定：

檢體中存在的曲狀桿菌，可在 48 小時後於 mCCDA 與 CSM 培養基上見到二類型的菌落，第一型為明顯灰色且濕潤的菌落，有光澤並有擴散趨勢，看上去似水滴，有延著接種線擴散 (spreading)生長的傾象，在 mCCDA 上

較常見。第二型菌落較圓整、凸起、發亮，無擴散，在 CSM 上較常見。若仍無發現可疑的菌落，則需再繼續培養直到滿 72 小時才可判定結果為陰性。

(五) 菌種區分與鑑定：

曲狀桿菌區分鑑定的流程如下：

- (1) 單一菌落再培養：將培養 48 小時培養基上的可疑菌落，挑 3~5 個重新接種至 mCCDA 培養基，置於 42°C 微氧的環境中培養，24 小時後觀察結果。若仍有灰色黏稠的菌落長出，則繼續進行生化反驗試驗，若無菌落長出，則該菌不是曲狀桿菌。
- (2) 顯微鏡檢驗：曲狀桿菌為格蘭氏陰性菌，在顯微鏡底下呈現典型的曲狀或是海鷗狀翅膀狀的粉紅色短桿菌。在進行染色時，最後的對比染色 safranin O 染的時間需稍加長，或是改用 carbofuchsin 作為對比染劑，如此可使染色結果更為明顯容易觀察。
- (3) 傳統生化試驗：將再培養的菌落利用曲狀桿菌特有的生化特性與其他細菌進行區分。
 - (a) Oxidase 試驗：曲狀桿菌皆為 oxidase 陽性，以接種針挑取少量的單一菌落，點在 oxidase 試驗條上，觀察顏色的變化。10 秒鐘內出現藍黑色者為 oxidase 陽性，反之為陰性。注意觀察時間不可過久，否則有產生偽陽性的可能。

(b) Catalase 試驗：曲狀桿菌為 catalase 陽性，在玻片上滴一滴 H_2O_2 ，以塑膠接種針挑取少量的單一菌落與 H_2O_2 相混合，若有氣泡產生為 catalase 陽性，反之為陰性。但目前亦發現有極少數 catalase 陰性的曲狀桿菌存在。

(c) 若以上的生化試驗皆符合，可初步判定為曲狀桿菌屬

(d) Hippurate 水解試驗：*C. jejuni* 特有的 hippuricase 可水解 sodium hippurate，當加入 ninhydrin 溶液後可呈現藍色，利用它可以將 *C. jejuni* 與其他的曲狀桿菌做區分。

(六) 聚合酶連鎖反應(PCR)：

根據曲狀桿菌屬各種間某些基因序列的差異，設計特定的引子 (primer)，利用 PCR 的方式，將各菌種獨特的基因片段增殖，再以洋菜電泳分析增殖後的產物並定出其序列，最後將該序列在資料庫中比對，如此可區分出曲狀桿菌屬中不同種的族群。目前用作區分鑑定 *C. jejuni* 的引子共有 2 組，分別是針對其特有的 hippuricase 蛋白基因 *hipO* [7] 以及毒素基因 *ceuE* [8] 設計；而區分 *C. coli* 的引子也為 2 組，分別是針對其 serine hydroxymethyltransferase 蛋白基因 *glyA* 和毒素基因 *ceuE*。其餘區分較少見之 *C. lari*、*C. fetus*、*C. upsaliensis* 各有一組。

PCR 的反應體積為 $50\ \mu\text{l}$ ，內含 500 mM Tris-HCl (pH 8.3)、100 mM

KCl、50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20 mM MgCl_2 、0.2mM deoxynucleoside triphosphate、2 U FastStart *Taq* DNA polymerase (Roche)、2.5 μl 以煮沸法得到的曲狀桿菌 DNA。各引子的反應濃度：*C. jejuni* 與 *C. lari* 為 0.5 μM ，*C. coli* 與 *C. fetus* 為 1 μM 。反應條件：95°C 6 分鐘，95°C 30 秒、59°C 30 秒、72°C 1 分鐘進行 30 個循環，最後為 72°C 7 min，約 2 小時後以 1.5 % 洋菜膠進行產物分析。

結果

本研究計劃首先由建立起曲狀桿菌的常規檢驗方法著手(詳見於材料與方法)。民國 92 年 12 月 8 日，本計劃以參考美國 CDC 的標準規範並自行加以改良後的新方法由五歲多的小兒腹瀉病患的肛門拭子檢體中分離出首例空腸曲狀桿菌 (*C. jejuni*)。隨著檢驗技術的漸趨純熟，至民國 93 年 12 月 27 日止又陸陸續續從不同地區之小兒腹瀉病患肛門拭子檢體中找出 65 件曲狀桿菌感染陽性的案例。共計 93 全年度檢出 66 件陽性個案。

將這 66 株曲狀桿菌進行生化試驗以及 PCR 的菌種區分鑑定的結果如圖一及表二。其中 oxidase 和 catalase 試驗結果均為陽性。66 株中有 64 株 (佔 93.9%) 在 hippurate 試驗呈現陽性，且利用引子 CJF-CJR 可在 PCR 反應放大出 323 bp 的 hippuricase 基因 (*hipO*) 的部分片段，表示他們皆為空腸曲狀桿

菌 (*C. jejuni*)。另外 4 株 (佔 6.1%) 為 hippurate 試驗陰性，以 PCR 反應無法放大出 *C. jejuni* 的 *hipO* 基因片段，但利用引子 CCF-CCR 以及 COL1-COL2 皆可放大出 *C. coli* 的 serine hydroxymethyltransferase 蛋白基因 *glyA* 的部分片段以及毒素基因 *ceuE*，表示其為大腸曲狀桿菌 (*C. coli*)。總計 93 年度 (92 年 12 月~93 年 12 月) 一共從約 860 件不同地區的小兒腹瀉檢體中分離出 66 株曲狀桿菌 (表一,二)，分離率約為 7.7%，經生化與 PCR 鑑定後確定包含 62 株 *C. jejuni* 以及 4 株 *C. coli* (表二)。此一新的曲狀桿菌檢驗流程 (請詳見材料與方法) 的採用，由檢體收件開始至鑑定結果確認，已由美國 CDC 原標準規範的 4~5 天縮短至 3 天，檢體的陽性率也有逐漸提高的趨勢。

這些感染曲狀桿菌之腹瀉患者 (表三) 的年齡層中，86.4% (57/66) 為小於 10 歲的小兒，其中小於 2 歲佔 3% (2/66)、2~10 歲佔 83.4% (55/66)、11 歲以上佔 13.6% (9/66)。在症狀方面首先以血便和發燒為監測目標，2 位小於 2 歲的患者皆有血便的症狀 (2/2)，但無發燒。2~10 歲的患者 27.3% 有血便 (15/55)、76.4% (42/55) 出現發燒症狀；11 歲以上患者 11.1% (1/9) 出現血便 55.6% (5/9) 出現發燒症狀。患者的每日腹瀉次數 (表三) 在 3 個年齡層均以 1~4 次居多，分別為 100% (2/2)、72.7% (40/55) 以及 88.9% (8/9)；每日腹瀉次數在 5~8 次的在 2~10 歲佔 25.5% (14/55)、10 歲以上佔 11.1% (1/9)。統計全年曲狀桿菌逐月的陽性發生率 (表五)，目前並沒有觀察到明顯的季節

趨勢。

討論

近年來曲狀桿菌對人類的影響愈來愈被重視，它雖很少造成致命的感染，卻仍為小兒腹瀉的一大元兇。歐美等已開發國家均設有各細菌的參考實驗室，對於彙整各地區細菌性感染資料的能力較高，曲狀桿菌的感染案例遠在大腸桿菌、沙門氏菌、志賀菌等之上。而開發中國家，由於各醫療機關向衛生單位報告之個案僅為冰山一角，導致曲狀桿菌的感染個案遠小於沙門氏與志賀菌等。除此之外根據美國 CDC 提供的研究報告顯示，曲狀桿菌在免疫功能正常的健康人也會造成約 12.2% 的無症狀感染，這可能也是造成許多開發中國家曲狀桿菌感染案例遠被低估的原因之一。衛生署現已將曲狀桿菌感染列於新感染症候群之內，並著手建立專屬的參考實驗室，可見對其重視的程度已慢慢追上各先進國家。

為了不斷提高對於曲狀桿菌的分離率，許多文獻均對其培養方法作多方面的評估，其中一致的結論是將患者的棉棒檢體直接接種在選擇性培養基 mCCDA 的方法對於曲狀桿菌的分離效果是最差的。這是因為 mCCDA 所含有的抗生素可能會抑制某些較少見的曲狀桿菌例如 *C. upsaliensis* 及 *C. fetus* 等等的生長。為了突破在檢驗方法上的瓶頸，近年來許多分離的新方法已被提出。它們包括了(1)先將檢體接種於曲狀桿菌專用的增菌培養液

(enrichment broth)24~48 小時之後，再以 Steele 和 McDermott [9]的濾膜法，將培養液過濾至不含抗生素的血液培養基中。如此只有曲狀桿菌等少數具有運動性的細菌可穿透 0.65 μ m 濾膜至血液培養基，不但可以減少其它雜菌對於曲狀桿菌生長的干擾，不含抗生素的血液培養基也可避免對少數曲狀桿菌敏感株的傷害 [10]。(2)將 mCCDA 的抗生素 cefoperazone 濃度由原本的 32 mg/l 降低至 8 mg/l，並加入可抑制其它腸內菌的抗生素 teicoplanin，以提高敏感菌種 *C. upsaliensis* 的分離率 [11]。除此之外，利用 PCR 等分子診斷技術由患者糞便檢體直接放大曲狀桿菌某特定基因的快速診斷法也慢慢被大家所應用，它的好處是敏感度比傳統培養的方法高出許多，同時也可將檢驗及鑑定的時間縮短至數小時之內 [12, 13, 14, 15, 16, 17]。由於目前國內較大型的醫學中心或是臨床實驗室進行此菌的檢驗時，往往基於成本與時間等的考量，無法利用上述其它的方法來提高分離率。因此疾病管制局站在防疫角度上仿效歐美國家建立國內曲狀桿菌參考實驗室，做好提高檢體分離率的種種評估，並對於國內的流病資料作完整的彙整有其絕對的必要性。

在本計劃今年所分離的 66 株曲狀桿菌當中，*C. jejuni* 共 62 株佔 93.9%，*C. coli* 為 4 株則佔 6.1%。雖然菌株蒐集的樣本數遠顯不足，但亦或顯示曲狀桿菌在台灣對人類的流行趨勢可能與歐美等國家相同。由患者的

年齡來看，以小於 10 歲的小兒為最大宗 (86.4%)，在症狀方面，66 位陽性患者共有 18 位出現血便症狀 (表四)，其中 94.4% (17/18) 為小於 10 歲的小兒，另一名的年齡為 17 歲；而出現發燒症狀的共有 47 位，89.4% (42/47) 小於 10 歲，大於 10 歲佔 10.6% (5/47)，這些都與美國 CDC 對於曲狀桿菌所報導的情況類似。儘管如此，目前我們仍須不斷累積足夠的菌株與患者群才可使這些流病資料更具有代表意義，但當前我們面臨的一大困難，是無法比照各醫院一樣要求檢體必須在採集後 4 小時內送達實驗室，現在送至本局的小兒腹瀉檢體幾乎都是採集後 2 天以上，其可存活的菌量將更為稀少，因此對於曲狀桿菌的檢驗方法每一流程都必須更加嚴謹小心。目前雖然許多實驗室標榜發展許多分子生物的快速診斷技術，以改進因檢體中細菌數太少導致培養不出的情形。但是若無法培養出菌落，不但會缺乏最直接確認的證據，同時也會導致往後各項流行病學的分析例如抗藥性試驗 [18,19]、菌種分子型別區分 [20,21,22] 等所需要的菌株沒有來源。因此對於曲狀桿菌的檢驗，本計劃將繼續以提高培養的分離率為最主要的研究方向，對於 PCR 甚至即時定量 PCR 等技術，在日後將試圖使之成為可信賴的快速診斷工具，以補傳統培養方法的不足。

結論與建議

本研究計劃對於曲狀桿菌的檢驗已建立了機制及專業的實驗室。經過

對其檢驗技術的評估與改良之後，分離率已提昇至約 7.7%，並且將檢驗及鑑定所需的時間，縮短至檢體收件後的第三天完成。除了常規的檢驗與鑑定之外，實驗室亦成功地應用 PCR 的分子診斷技術，不僅可作為輔助鑑定之用，將來更可以作為快速診斷的一項工具。隨著分離率的逐漸提高，疾病管制局藉由本計劃對於曲狀桿菌參考實驗室的建立來說可說是跨出了提供常規檢驗服務的開端，對於曲狀桿菌若有疑問，請與本單位聯絡，我們必會盡力解決各位的難題。

致謝

本研究承蒙趙小兒科、中崙聯合診所等熱心提供小兒腹瀉檢體，以及國防部對於國防訓儲人力的支援，使我們得以順利完成曲狀桿菌的分離與鑑定，僅此致謝。

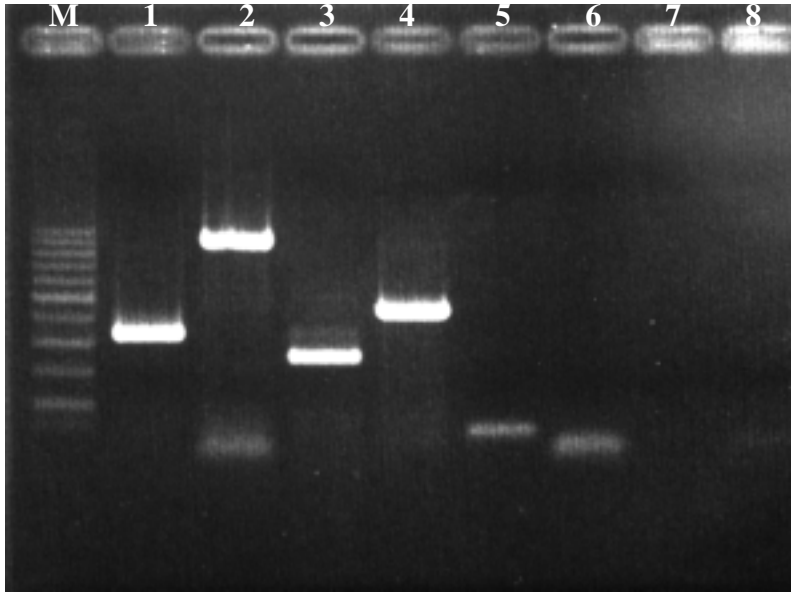
參考文獻

1. Coker AO, Isokpehi RD, Obi CL, *et al.* Human Campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* 2002, 8: 237-243.
2. Padungton P and Kaneene JB. *Campylobacter spp.* in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci*, 2003, 65: 161-170.
3. Altekruse SF, Stern NJ, Swerdlow DL, *et al.* *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 1999, 5: 28-35.
4. Endtz HP, Guijs GJHM, Mouton RP, *et al.* Comparison of six media,

- including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 1007-1010.
5. Bang DD, Nielsen EM, Madsen M, *et al.* PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Appl Microbiol* 2003, 94: 1003-1014.
 6. Lin CW, Yin PL, *et al.* Incidence and clinical manifestations of *Campylobacter* enteritis in central Taiwan. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei)* 1998, 61: 339-345.
 7. Wang G, Clark CG, Rodgers FG, *et al.* Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 4744-4747.
 8. Gonzalez I, Grant KA, Collins MD, *et al.* Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 759-763.
 9. Steele TW, McDermott SN. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology* 1984, 16:263-265.
 10. Atabay HI and Corry JEL. The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol* 1998, 84: 733-740.
 11. Corry JEL, Atabay HI. Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCDA) agar for various strains of *Campylobacter*,

- Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*. *Int. J Food Microbiol* 1997, 38: 201-209.
12. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69: 3435-3447.
 13. Linton D, Lawson AJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 2568-2572.
 14. Chuma T., Yano K., Yugi H. *et al.* Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 1997, 59:85-87.
 15. Sails A. D., Fox A. J., Greenway D.L. *et al.* A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69:1383-1390.
 16. Nogva H. K., Bergh A., Rudi K. *et al.* Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66:4029-4036.
 17. Best E. L., Powell E. J., Frost J. A. *et al.* Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters.* 2003, 229:237-241.
 18. Li CC, Chiu CH, Wu JL, *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. *Scand J Infect Dis.* 1998, 30:39-42.
 19. Christiane G. and Huguette G. Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1998, 42:2106-2108.

20. David L.W. and Frank G. R. Identification of *Campylobacter* heat-stable and heat-labile antigens by combining the Penner and Lior serotyping schemes. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 741-745.
21. Irving N., Kathleen B. and Charlotte P. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1993, 31: 1531-1536.
22. Olivia L.C. Emma L.B and Jennifer A.F. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacters*. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 2263-2265.



圖一、利用 PCR 區分鑑定曲狀桿菌之結果

將曲狀桿菌各菌種的參考菌株，萃取其 DNA，利用特定之引子放大各相對應基因的結果。Lane 1：ATCC 49943 (*C. jejuni*)DNA 為模板，primer 為 CJF/CJR，產物大小為 323 bp.；lane 2：ATCC 43133 (*C. coli*)，COL1/COL2 primer，產物為 894 bp.；lane 3：ATCC 35221 (*C. lari*)，CLF/CLR primer，產物為 251 bp.；lane 4：ATCC 25936 (*C. fetus* spp. *fetus*)，CFF/CFR primer，產物為 435 bp.。Lane 5~lane 8 依序是將 lane 1~lane 4 的模板以水取代作為控制組，各 primer 均不變。M：100 bp DNA ladder。電泳條件：1.5% SeaKem LE agarose，100 伏特電壓分析。

表一、曲狀桿菌在不同檢體來源的陽性率

Sources of specimens	No. of total specimens	No. of positive cases	Positive rate (%)
PC-1	687	40	5.8
PC-2	88	6	6.8
PC-3	9	2	22.2
PC-4	7	1	14.3
C-1	1	1	100
C-2	68	16	23.5

PC : pediatric clinic, PC-1, PC-3 and PC-4 are located in Taipei county, PC-2 is located in Taipei city.

C : clinic, C-1 and C-2 are located in Taipei city and Tainan.

Period of the specimens collection from December 1, 2003 to December 27, 2004

表二、66 位腹瀉患者分離出之曲狀桿菌的鑑定結果

No. of isolates	No. of Oxidase positive	No. of Catalase positive	No. of Hippurate positive	PCR product (CJF ¹ -CJR ² primer)	PCR product (COL1 ³ -COL2 ⁴ primer)	Identification
62	62	62	62	323 bp	-	<i>C. jejuni</i>
4	4	4	0	-	894 bp	<i>C. coli</i>

Primer sequences :

- (1) 5' ACTTCTTTATTGCTTGCTGC 3'
- (2) 5' GCCACAACAAGTAAAGAAGC 3'
- (3) 5' ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGCA 3'
- (4) 5' ATTTTATTATTTGTAGCAGCG 3'

表三、不同年齡群的曲狀桿菌感染患者之臨床症狀比較

Age (year)	No. of patients	Bloody diarrhea		Fever		Times of diarrhea /day		
		+	-	+	-	1~4	5~8	>8
<2	2	100% (2/2)	0	0	100% (2/2)	100% (2/2)	0	0
2~10	55	27.3% (15/55)	72.7% (40/55)	76.4% (42/55)	23.6% (13/55)	72.7% (40/55)	25.5% (14/55)	1.8% (1/55)
>10	9	11.1% (1/9)	88.9% (8/9)	55.6% (5/9)	44.4% (4/9)	88.9% (8/9)	11.1% (1/9)	0

Total number of *Campylobacter*-infected patients were 66.

表四、曲狀桿菌患者血便和發燒症狀之年齡層分布情形

Symptom	Age (year)	
	0~10	>10
No. of Bloody diarrhea	17	1
(%)	94.4	15.6
No. of fever	42	5
(%)	89.4	10.6

Total number of patients who had bloody diarrhea were 18.

Total number of patients who had fever were 47.

表五、不同月份曲狀桿菌之檢出狀況

Month	(92) 12	(93) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. of specimens	42	41	32	93	48	71	59	80	84	120	75	59	56
No. of positives	4	3	1	2	6	4	4	5	1	18	4	4	4
Positive rate (%)	9.5	7.3	3.1	2.2	12.5	5.6	6.8	6.3	1.2	15	5.3	6.8	7.1

Total number of specimens were 880.

Total number of Campylobacteriosis were 66.