

食品中不明微生物之國際能力試驗評鑑成果

王鈺婷 黃翠萍 塗子毅 許仲霆 蔡行恩 蘇美安
劉宗彥 林旭陽 鍾月容 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署 研究檢驗組

摘 要

為確實做好食品衛生安全把關工作維護民眾健康，衛生福利部食品藥物管理署(以下稱食藥署)積極參與國際知名機構舉辦之食品檢驗能力試驗。2015年參加英國中央科學實驗室主辦之食品微生物檢驗能力試驗FEPAS Proficiency Testing Program-食品中毒未知目標病原微生物之檢測，該試驗中模擬食品中毒案情境中毒症狀，受測單位需自行研判案情，並由測試檢體為「辣味牛肉飯」餐食，擬定檢驗策略進行分析，判定測試檢體中引發食品中毒之病因物質。食藥署結合傳統培養法、生化代謝鑑定、核酸分析及蛋白質質譜分析技術，於時限內成功檢出該測試檢體中含沙門氏桿菌(*Salmonella* spp.)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)。全球共12間實驗室參加此能力試驗，其中有6間可正確判定「沙門氏桿菌」為此模擬中毒案情境之主要肇因病原，而食藥署則是唯一可準確鑑別出測試檢體中所有3種微生物的實驗室，顯示食藥署對於食品中毒病原菌及未知目標微生物之檢測能力均達國際水準。

關鍵詞：不明微生物、能力試驗

前 言

食藥署持續致力於食品微生物檢驗技術之開發、精進，並將其轉化為公告及建議檢驗方法供外界使用，更實際應用於市售產品之調查研究。能力試驗計畫(Proficiency Testing Program, 簡稱PT Program)，又稱盲樣測試計畫或績效評鑑計畫，受測實驗室接受提供能力試驗計畫機構發送之測試檢體(盲樣)進行檢測，於規定期間內將結果送交提供計畫的機構，由該機構發布受測實驗室之測試結果並列出各參加者之檢測值、測試結果平均值，並與該盲樣配製值、確認值、平均值、標準偏差值、合格

範圍評鑑參加者結果是否合格。

執行能力試驗計畫普遍成為認證機構對所認證實驗室績效評鑑的標準模式，其中英國中央科學實驗室每年舉辦之食品微生物檢驗(Food Examination Performance Assessment Scheme, FEPAS)能力試驗更為國際間具高度公信力之能力試驗計畫。食藥署至2015年共參加英國FEPAS能力試驗20場次，歷年均獲優良成績，2015年除參加「沙拉中沙門氏桿菌」、「魚肉中腸炎弧菌」及「雞肉中李斯特菌」3項重要食因性病原之檢測能力試驗，更首次受邀參加2015年舉辦FEPAS國際能力試驗中「不明微生物能力測試」計畫，模擬食品中毒案之

案情及中毒症狀，提供受測單位1件乾燥辣味牛肉飯盲樣檢體，要求受測單位判明引發該食品中毒案件之肇因病原，以及分析盲樣檢體中是否含有其他微生物，以完整描繪檢體中微生物分布情況。

材料與方法

一、檢體確認及前處理

英國中央科學實驗室能力試驗計畫FEPAS提供150克乾燥辣味牛肉飯檢體，食藥署按其附說明，加入90 mL Buffered Peptone Water進行檢體回溶，分別進行real-time PCR病原菌快速篩檢及好氧、微好氧及厭氧之傳統增菌培養。

二、檢驗方法

(一)食因性病原菌Real-time PCR快速篩檢
檢體回溶後，取部分上清液以沸騰水浴加熱10分鐘，經14000 rpm離心5分鐘，取上清液，利用食藥署已公告之食因性病原菌檢驗方法⁽¹⁾以及食藥署已建立並通過實驗室內部確效測試之real-time PCR快速檢驗方法⁽²⁻⁴⁾進行快速篩檢，所使用之專一性引子與探針序列，詳表一。

檢體經BHI或LB培養液增殖24小時後，取1 mL菌液以沸騰水浴加熱10分鐘，經14000 rpm離心5分鐘，取上清液，以沙門氏桿菌特異性引子(invA-F & invA-R)與螢光探針(invA-P)於即時PCR反應系統(ABI 7500HT Fast Real-Time PCR System)分析，並以正對照菌株(*Salmonella typhimurium*, BCRC 12947)，產生螢光擴增曲線，無菌純水(負對照組)則無訊號作為檢測結果之確效反應。

檢體經BHI培養液增殖24小時後，劃線至M-PA-C選擇性培養基生成疑似綠膿桿

菌之典型菌落，挑取單一菌落以TSA培養基再次純化後，刮取菌落至無菌純水並以沸騰水浴加熱10分鐘，經14000 rpm離心5分鐘，取上清液，續以綠膿桿菌特異性引子(ecfX-F & ecfX -R)與螢光探針(ecfX-P)以即時PCR反應系統(ABI 7500HT Fast Real-Time PCR System)分析進行即時PCR分析。並以正對照菌株(*Pseudomonas aeruginosa*, BCRC 15541)，產生螢光擴增曲線，無菌純水(負對照組)則無訊號作為檢測結果之確效反應。

(二)傳統增菌培養

取檢體回溶後上清液，取25 mL以非選擇性增殖培養液Brain Heart Infusion (BHI) broth序列稀釋後，經35°C培養24小時，並將增菌液塗佈於Baird-Parker agar (BPA) 培養基、Mannitol Egg Yolk Polymyxin agar (MYP) 培養基、MacConkey agar培養基及Eosin-Methylene-Blue agar (EMB) 培養基確認是否含有金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌、大腸桿菌或其他可疑菌落生成；另各取25 mL上清液至225 mL之單核球增多性李斯特菌增殖用培養液UVM broth、沙門氏桿菌增殖用培養液LB broth、耶辛尼氏腸炎桿菌增殖用培養液Peptone Sorbital Blue broth (PSBB)、金黃色葡萄球菌選擇性增殖用培養液10%氯化鈉之Tryptase Soy Broth (TSB)及曲狀桿菌增殖用培養液*Campylobacter* enrichment broth，依其使用特性分別於好氧、微好氧環境以35°C培養1-5天，之後依食藥署公告之食品中單核球增多性李斯特菌、沙門氏桿菌、耶辛尼氏腸炎桿菌、金黃色葡萄球菌及曲狀桿菌檢驗方法⁽¹⁾確認檢體中是否含有上述目標病原菌；剩餘上清液以Cooked Meat broth (CMM)於厭氧環境下以35°C培養3-5天，如發現增菌現象即沾取菌液塗佈至Egg Yolk agar (EYA) 培養基以分離純化可

疑菌落⁽¹⁾。

(三)菌種鑑定

培養基上生成之可疑菌落，先劃至Tryptcase Soy agar (TSA)培養基進一步分離確認菌落純化程度，挑取單一菌落經TSA培養基再次純化，以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer, MALDI-TOF MS)(Biotyper, Bruker, Germany)藉由分析比對菌體之蛋白質質譜以達菌種鑑定鑑定菌種，鑑定分數大於2.0表示該次鑑定為可信結果，續以全自動微生物生化分析儀(VITEK 2 Compact, BioMérieux, France)確認菌種鑑定結果；如上述2種菌種鑑定平台皆未能得到良好菌種鑑定結果，續以本實驗室已建立之食因性病原菌菌種特異性real-time PCR或16S 核糖體DNA序列分析確認菌種⁽⁵⁾。

(四)血清學鑑定

挑取生長於TSA培養基上之菌落經菌種鑑定確認為沙門氏桿菌，以市售沙門氏桿菌血清套組(Denka Seiken, Salmonella Antisera Set 1)鑑定體抗原(O antigen)型別。

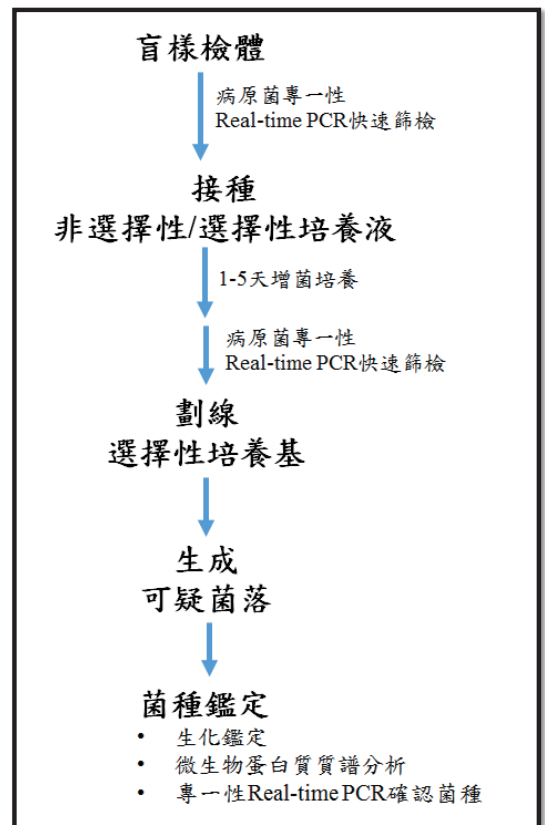
結 果

一、由食品中毒案件案情及中毒症狀初步判定為細菌性污染食物所致

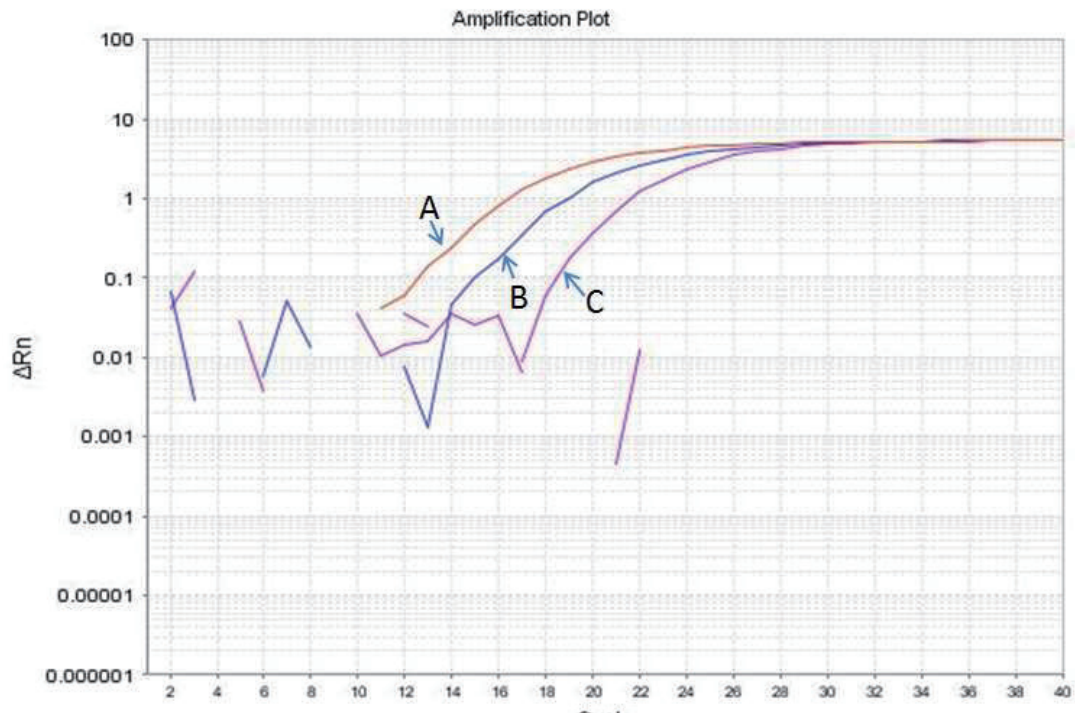
盲樣檢體所附案情簡述，說明本試驗係模擬一場食品中毒案，患者於食用辣味牛肉飯後，於12 - 72小時後出現腹瀉、發燒、痙攣等臨床症狀。由上述描述及該項食物高風險微生物污染特性，初步排除弧菌、病毒及真菌性污染，推測肇因物質應為食因性病原細菌。

二、Real-time PCR快速篩檢檢體中沙門氏桿菌

本次試驗屬未知標之物之檢驗，藉由食品中毒症狀、潛伏期及盲樣檢體特性推論肇因物質為食因性病原細菌，設計一套由初步篩選至最後鑑別確認之檢驗流程(圖一)：將盲樣檢體(乾燥辣味牛肉飯)回溶取上清液直接進行real-time PCR快速檢測，測試金黃色葡萄球菌、沙門氏桿菌、單核球增多性李斯特菌、曲狀桿菌、大腸桿菌、仙人掌桿菌、耶辛尼氏腸炎桿菌皆無產生陽性反應。經BHI、LB及CMM等培養液培養皆出現增菌現象，續以real-time PCR確認在BHI及LB培養液增菌後沙門氏桿菌出現陽性反應(圖二)，至此確定檢體中的確存



圖一、未知標的病原微生物檢驗流程設計



圖二、沙門氏桿菌之Real-time PCR快速篩檢情形

- A. 正對照組(*Salmonella typhimurium*, BCRC12947)
- B. 檢體經BHI培養液增殖24小時
- C. 檢體經LB培養液增殖24小時

在沙門氏桿菌，且由反應強度推測沙門氏桿菌可能為本案肇因病原。

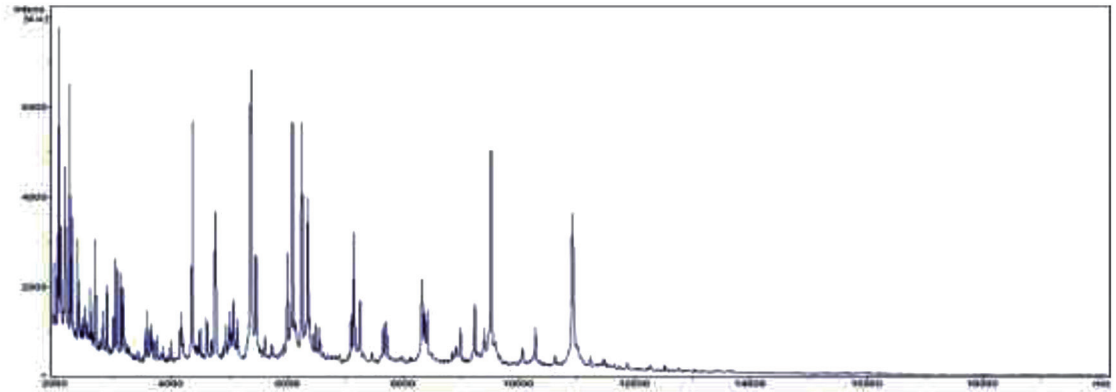
三、確認沙門氏桿菌為本案肇因病原

檢體上清液經LB 培養液確認有明顯增菌情形，勾取菌液至選擇性培養液Rappaport-Vassiliadis (RV)及Tetrathionate (TT) Broth，培養後仍有顯著增菌情形，續將增菌液接種至Xylose-Lysine-Deoxycholate agar (XLD)培養基，出現沙門氏桿菌之粉紅色、帶有光澤黑色中心之典型菌落，挑取單一菌落經TSA培養基再次純化，以微生物蛋白質譜(Biotyper)(圖三A)及生化代謝特性分析(VITEK 2 Compact)確認其為沙門氏桿菌，經血清學檢測該菌株型別為O18。

四、檢體中另含綠膿桿菌及表皮葡萄球菌

由BHI培養液序列稀釋培養，在EMB培養基出現非典型且形態單一菌落，挑取菌落經TSA培養基增殖純化後，以微生物蛋白質譜之鑑定結果為綠膿桿菌(圖三B)，劃線M-PA-C洋菜培養基培養，呈現中央呈褐色至墨綠色且邊緣光亮之綠膿桿菌典型菌落，續挑取該典型菌落劃線於牛乳洋菜培養基(Milk agar)亦呈現牛乳之酪蛋白(casein)水解且呈黃綠色擴散型態，挑取單一菌落經TSA培養基再次純化，經生化代謝特性分析(VITEK 2 Compact)及通過食藥署內部確效之綠膿桿菌專一性real-time PCR檢測方法(表一)確認其為綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)⁽⁶⁾ (圖四)。

A. *Salmonella* spp. (score: 2.320)



表一、食因性病原菌專一性Real-time PCR引子及探針

目標病原菌 (Target pathogen)	標的基因 (Target genes)	引子/探針序列(5'→3') (Specific primers & probes for target pathogens)	參考文獻 (Reference)
金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>nuc</i>	Forward primer: AAATTACATAAAGAACCTGCGACA Reverse primer: GAATGTCATTGGTTGACCTTTGTA Probe: FAM-AATTAAACCGTATCACCATCAATCGCTTT-BHQ	1
仙人掌桿菌群 (<i>Bacillus cereus</i> group)	<i>gyrB</i>	Forward primer: GCCCTGGTATGTATATTGGATCTAC Reverse primer: GGTCATAATAACTTCTACAGCAGGA Probe : FAM-GGTCATAATAACTTCTACAGCAGGA –MGB	3
單核球增多性李斯特菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>iap</i>	Forward primer: AACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTA Reverse primer: TAGGCGCAGGTGTAGTTGCT Probe: FAM-CTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGC-BHQ	1
綠膿桿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	<i>ecfX</i>	Forward primer: 5-CGCATGCCTATCAGGCGTT-3 Reverse primer: 5-GAACTGCCCAGGTGCTTGC-3 Probe: FAM-ATGGCGAGTTGCTGCGCTTCCT-BHQ	6
沙門氏桿菌 (<i>Salmonella</i> spp.)	<i>invA</i>	Forward primer: CAACGTTTCTGCGGTACTGT Reverse primer: CCCGAACGTGGCGATAATT Probe: FAMCTCTTTCGTCTGGCATTATCGATCAGTACCA-BHQ	1
大腸桿菌 (<i>Escherichia coli</i>)	<i>uidA</i>	Forward primer: CAACGAAGTGAAGTGGCAGA Reverse primer: CATTACGCTGCGATGGAT Probe: CY5-CCCGCCGGGAATGGTGATTAC-BHQ	2
耶辛尼氏腸炎桿菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	<i>cel</i>	Forward primer: GCAAGTTTGATATTCTGTTC Reverse primer: GATCCATCATCAACTGTG Probe: FAM-TTCAACTCAGCCACCGCCTA-BHQ	4
曲狀桿菌 (<i>Campylobacter</i> spp.)	16S gene	Forward primer: CACGTGCTACAATGGCATAT Reverse primer: GGCTTCATGCTCTCGAGTT Probe: FAM-CAGAGAACAATCCGAAGTGGGACA-MGB	1
細菌菌種鑑別(定序用)	16S rDNA	Forward primer: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG Reverse primer: 5-GGTTA CCTTGTTACGACTT	5

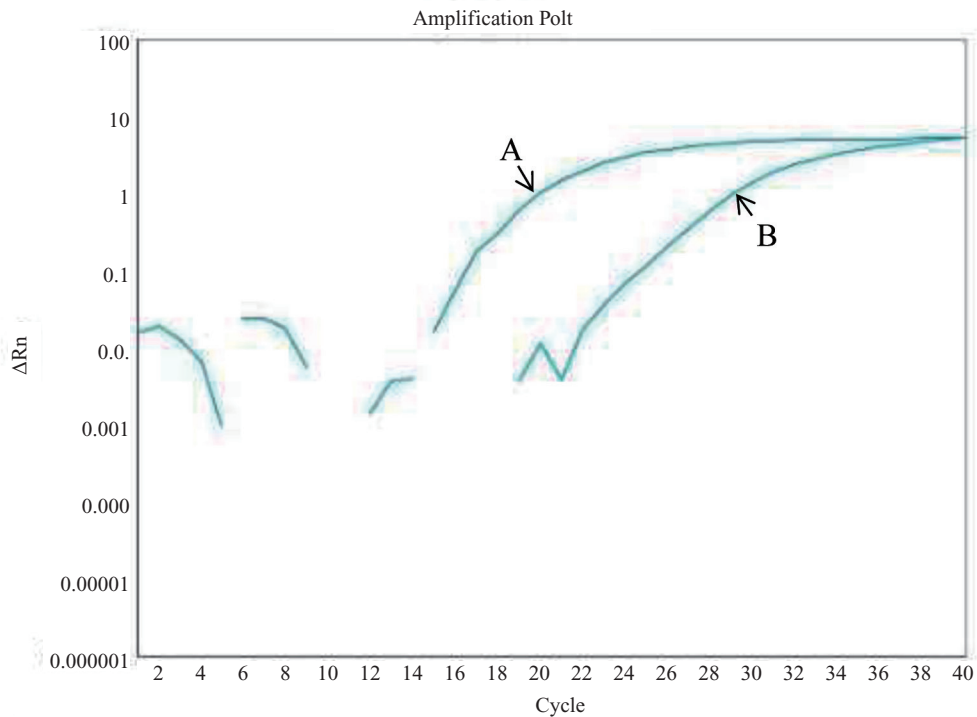
另將CMM培養液於EYA培養厭氧培養，亦出現型態單一之菌落，以微生物蛋白質譜(圖三C)及生化代謝特性分析(VITEK 2 Compact)之鑑定，確認其為表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)。

討 論

因應國際認證之需，食藥署自早期每年均參加英國中央科學實驗室舉辦之包括「沙拉」、「奶粉」、「液蛋」、「雞肉」、「巧克力」、「胡椒粉」等不同食品基質之沙門氏

桿菌能力試驗計畫，截至2015年本實驗室均得到滿意結果。顯示本實驗室人員之檢驗能力及公告檢驗方法⁽¹⁾值得全民信賴。

2015年食藥署首次受邀參加英國中央科學實驗室舉辦FEPAS國際能力中「不明微生物精準度測試」計畫，除循往例參加FEPAS國際能力特定微生物項目，如「沙拉中沙門氏桿菌」、「魚肉中腸炎弧菌」及「雞肉中李斯特菌」3項能力試驗，並均通過測試結果。在3月份收到「辣味牛肉飯」，隨案附知模擬之食品中毒案情境，包括中毒症狀、潛伏期及涉嫌食品等資訊，惟病因物質不明。



圖四、綠膿桿菌之Real-time PCR快速篩檢情形

- A. 正對照組(*Pseudomonas aeruginosa*, BCRC15541)
B. 自檢體分離疑似綠膿桿菌菌落

依據該能力試驗主辦單位提供之情境模擬，由原因食品(盲樣檢體)為辣味牛肉飯，由此可排除與海鮮類污染相關之弧菌類、真空食品好發之厭氧菌及食因性病毒污染之可能性，續依其臨床症狀及潛伏期，排除真菌污染之可能性，初步確認此案應為與畜產品相關之病原菌如沙門氏桿菌、曲狀桿菌、耶辛尼氏菌，或與食物製程(人員、環境)污染之病原菌如仙人掌桿菌、金黃色葡萄球菌、病原性大腸桿菌及單核球增多性李斯特菌等。因此在以BPW稀釋液回溶待測檢體後，直接塗佈於B-P培養基、MYP培養基、MacConkey培養基及EMB培養基確認是否含有金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌及大腸桿菌，並同時接種於非選擇性增殖培養液如BHI培養液及LB培養液、單核球增多性李斯特菌增殖用之UVM培養液、食品中金

黃色葡萄球菌篩選用之含10%氯化鈉之TSB培養液及耶辛尼氏菌增殖用培養液PSB培養液於好氧環境下培養；並針對曲狀桿菌特性採其增殖用培養液*Campylobacter enrichment broth*於微好氧環境下培養；為確認該檢體中含有其他兼性厭氧菌但在好氧環境非優勢增殖，另接種於CMM培養液進行厭氧培養確認之，以期完整呈現該檢體所含菌相。

大多數食因性病原菌須達一定菌量方能造成食品中毒症狀，故推測該檢體是在培養增殖24小時後，由real-time PCR反應其所含菌種。由24小時培養後增殖液結果顯示僅*Salmonella* spp.專一性之real-time PCR反應有明顯之陽性螢光訊號，且*Salmonella* spp.亦符合該情境內食品中毒症狀，故推測*Salmonella* spp.為肇因病原。

另在該盲樣檢體中同時測出綠膿桿菌及表皮葡萄球菌，一般認知此二者非食品中毒主要病原菌，綠膿桿菌存在於環境中，分泌多種的色素，包括綠膿菌素(呈青色)、螢光素(呈螢光黃色)，在42℃的環境下生長的能力⁽⁷⁾，臨床上常見於免疫缺陷病患之伺機性感染，一般影響肺部及泌尿道，或造成燒傷、傷口及其他血液感染，如敗血病⁽⁸⁾，但在近年亦發現南台灣地區加水站之綠膿桿菌高檢出率⁽⁹⁾，顯示綠膿桿菌於食品安全之風險亦不容忽視；表皮葡萄球菌滋生於生物體表皮如人體的皮膚，陰道等部位，屬正常菌群類型⁽¹⁰⁾，造成感染原因大多為免疫低下病人之院內感染⁽¹¹⁾，但少數報導指出其因可能表現腸毒素而導致食品中毒^(12,13)，其兼性厭氧特性使其雖未在好氧環境下被分離出，但在厭氧條件下顯其優勢而產生明顯菌落。

依據主辦單位綜合分析報告發布之訊息，該盲樣檢體基質(牛肉、米飯及辣椒粉)中添加沙門氏桿菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Cerro*, 1.99 log CFU/g)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, 1.80 log CFU/g)及綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*, 2.26 log CFU/g) 3株微生物。全球參加實驗室共12間提報提結果，有6間實驗室正確判定致病微生物為「沙門氏桿菌」，除外，食藥署針對盲樣檢體特性，設計一套全面性篩選系統，並巧妙結合傳統培養法、分子生物學技術及質譜鑑別系統，策略性逐步縮小目標範圍，以多元平台共同確認肇因病原及其他微生物。由主辦單位發布之報告，呈現食藥署優異成績，且為唯一準確鑑別出測試檢體中添加3株病原微生物之實驗室，顯示食藥署對於食品中毒病原菌及未知目標微生物檢測能力達國際水準，更凸顯食藥署國家實驗室之優良形象。

參考文獻

1. 衛生福利部食品藥物管理署。2013-2015。公告檢驗方法。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=103>]。
2. Chern, E.C., Siefring, S., Paar, J. and *et al.* 2011. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett Appl Microbiol.* 52(3): 298-306.
3. Dzieciol, M., Fricker, M., Wagner, M. and *et al.* 2013. A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. *Food Control.* 32(1): 176-185.
4. Thomson, N.R., Howard, S., Wren, B.W. and *et al.* 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet.* 2(12): e206.
5. Lipson, D.A. and Schmidt, S.K. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the colorado rocky mountains. *Appl Environ Microbiol.* 70(5): 2867-2879.
6. Amagliani, G., Parlani, M.L., Brandi, G. and *et al.* 2012. Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water. *Int J Environ Health Res.* 22(1): 60-70.
7. King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med.* 44(2): 301-307.
8. Todar, K. 2008-2012. Todar's Online Textbook of Bacteriology. [<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>].
9. 台南市政府全球資訊網-最新消息。2013。加水站水質切勿生飲。

- [<http://www.tainan.gov.tw/tainan/mobile/mobile-page.asp?id=%7B240A228E-BC8F-468C-A3DC-B5A0ED7B50A1%7D>] °
10. Fey, P. D. and Olson, M. E. 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 5(6): 917-933.
 11. Levinson, W. 2010. Review of Medical Microbiology and Immunology (11th ed.) pp. 94-99.
 12. Crass, B. and Bergdoll, M.S. 1986. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin Microbiol.* 23: 43-45.
 13. Barretti, P., Montelli, A.C., Batalha, J.E. and *et al.* 2009. The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. *BMC Infect Dis.* 9: 212.

The Evaluation of Performance for Detecting Pathogenic Microorganisms in FEPAS Proficiency Test in 2015

YU-TING WANG, TSUI-PING HUANG, TZU-YI-TU, CHUNG-TING HSU,
SHING-EN YSAI, MEI-AN SU, TSUNG-YEN LIU, CHE-YANG LIN,
HSU-YANG LIN, YUEH-JONG CHUNG,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

For the purpose of food safety management, TFDA participates in accredited laboratory proficiency tests (PT) organized by well-known international institutions to evaluate the performance of personnel working in microbiological detection and analysis annually. In 2015, TFDA participated in food microbiological trials of FEPAS proficiency test program conducted by the UK Central Science Laboratory. In the trial of unknown target microorganisms, FEPAS PT program simulated the scenarios of a food poisoning case in which the symptoms of diarrhea, fever, abdominal pain were found in the latency of 12 - 72 hours. The test sample “spicy beef and rice meals” was provided for each participant to determine the trigger agent causing food-poisoning symptoms and other microorganisms also present in the test sample. TFDA developed a strategy for analyzing unknown microorganisms, in which traditional culture, biochemical identification, nucleic acid analysis and proteomic technology were combined for multi-check the species and features of microorganisms found. Within the limited time, TFDA successfully identified *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* from the test sample, and convicted *Salmonella* spp. as the major trigger agent. A total of 12 laboratories participated in this PT program, and six of them determined “*Salmonella* spp.” was the causing agent of this food poisoning case. However, only TFDA accurately identified all 3 inoculated pathogens and displayed the professional ability in detecting unknown microorganisms.

Key words: unknown food poisoning microorganisms, proficiency test.