

出國報告（出國類別：其他）

分子生物技術在食品檢驗上之應用

服務機關：經濟部標準檢驗局

姓名職稱：閻慧貞技士

派赴國家：美國

出國期間：94年12月11日至95年1月8日

報告日期：95年4月6日

目錄

壹、前言	
一、緣起與目的.....	4
二、研習內容.....	5
三、研習行程.....	7
貳、研習過程	
一、華盛頓州立大學食品科技與人類營養學研究所 Kang Dong-Hyun 博士研究室.....	8
二、分子生物技術在食品檢驗上之應用（一）－ 美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫.....	9
三、Saigene [®] Corporation 研發之沙門氏桿菌快速分子生物檢測方法的驗證.....	15
四、愛達荷州莫斯科市小型屠宰場的環境、牛隻和羊隻屠體的衛生監測.....	16
五、華盛頓州立大學生物系統工程學研究所和觀摩食品工業用加熱法之微生物驗.....	17
六、華盛頓州衛生廳公共衛生實驗室.....	18
七、分子生物技術在食品檢驗上之應用（二）－ 美國華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫.....	20
八、分子生物技術在食品檢驗上之應用（三）－ 美國疾病管制局食因性病原菌實驗室分子分型即時監視網.....	24
參、研習心得與建議事項.....	30
肆、附錄	
一、美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫－沙門式桿菌 BAX [®] PCR 檢驗標準作業程序書	
二、美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫－腸出血型大腸桿菌 O157:H7 BAX [®] PCR 檢驗標準作業程序書	
三、美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫－病原性大腸桿菌 mPCR 檢驗標準作業程序書	
四、美國華盛頓州政府公共衛生實驗室－海水糞便型大腸桿菌群檢驗標準作業程序	

- 五、美國華盛頓州政府公共衛生實驗室－腸炎弧菌 RT-PCR 檢驗標準作業程序書
- 六、美國疾病管制局－腸出血型大腸桿菌 O157:H7、沙門氏桿菌和志賀氏桿菌脈衝式電泳標準作業程序書

壹、前言

一、緣起與目的

台灣是富裕的國家也是美食天堂，民以食為天，街頭巷尾餐廳林立，美食雜誌和美食達人興起，民眾亦樂衷於人氣餐廳的網路票選活動。近年來，攸關民眾食品衛生安全相關的議題，如來自法國的配方奶粉污染坂崎腸桿菌事件和美國牛肉是否開放進口等，常是國會民意代表的質詢焦點，媒體和消費大眾亦逐漸重視和關心，依據我國衛生署『93年食品中毒發生狀況與病因物質分類統計』的統計資料，93年全年食物中毒案例共274件，患病人數總計3992人，死亡人數總計2人；細菌為病因物質計81件，生病人數計1482人；化學物質為病因物質計4件，生病人數計19人；天然毒素為病因物質計11件，生病人數計221人；病因物質不明者計178件，生病人數計2270人。

我國食品衛生管理法第11條第1項第4款規定『食品 and 食品添加物染有病原菌者，不得製造、加工、調配、包裝、運送、儲存、販賣、輸入、輸出、贈與或公開陳列。』，因此無論是國內自產自製自銷食品、進口食品或是外銷食品都應該符合衛生安全，保障消費者健康。食品衛生管理法第二十五條則規定『食品衛生檢驗之方法，由中央主管機關公告指定之；未公告指定者，得依國際間認可之方法為之。』，目前國內各級主管機關所屬食品衛生檢驗機構或是其他受委託之食品衛生檢驗機構多採用衛生署公告方法或是中國國家標準作為試驗方法之依據，然而中國國家標準和衛生署公告方法所規定的食品微生物檢驗方法，係依據傳統食品微生物學分析技術，以中國國家標準總號第10952號「食品微生物檢驗方法-沙門氏桿菌之檢驗」為例，檢驗程序依序由增菌培養、選擇性增菌培養、選擇性鑑別培養、純株培養、生化學鑑定和血清學鑑定等各項步驟始完成檢驗。這些傳統食品微生物分析技術已應用了數十年，為人類食品衛生安全貢獻良多，但仍受限於許多缺點包括實驗步驟繁瑣、費時、檢驗人員專業度要求高等，尤其是時間需求較長，這表示在檢驗完成之前，原料可能已被加工成半成品或成品，易腐敗的產品已被配送、販售甚或被消費者買回家食用，對於食品衛生安全的管控上實為需要強化之處。

快速的微生物學檢驗技術推陳出新，有免疫抗體技術、酵素基質培養技術和分子生物技術等，依據這些技術的原理而開發出來的食品檢驗試劑套組和儀器亦被審慎評估其檢驗能力，如美國藥物食品檢驗局出版的微生物分析手冊

(Bacteriological Analytical Manual ; BAM)、美國農業部食品安全檢驗局出版的微生物實驗室指引 (Microbiology Laboratory Guidebook) 和美國公定化學家學會出版的公定方法 (AOAC Official Method) 等，因為我國尚未核可公告以分子生物技術為試驗原理的食品微生物檢驗方法，此行赴美研習期能瞭解美國應用分子生物技術在食品檢驗上之實務和經驗，作為日後本局微生物實驗室運作的參考。

二、研習內容

本次研習計畫係依據經濟部國際合作處 94 年 11 月 29 日經國處字第 09403075560 號函通知赴美國研習，研習主題為「分子生物技術在食品檢驗上之應用」，自 94 年 12 月 11 日啓程赴美至 95 年 1 月 8 日返國，為期 4 週。

研習內容主要分為兩部分，首先參訪美國華盛頓州立大學食品科學與人類營養學研究所 (Washington State University Department of Food Science and Human Nutrition) Kang Dong-Hyun 博士的研究室，經由 Kang 博士在食品衛生安全領域專研多年的經驗，介紹我瞭解美國農業部主辦的持續性生鮮蔬果微生物監視計畫 (Microbiological Data Program)，這個計畫在 2005 年的年度計畫中將自動化聚合酶鏈鎖反應儀 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) 應用在生鮮蔬果中腸出血型大腸桿菌 O157:H7 和沙門氏桿菌 (*Salmonella*) 的篩選檢驗方法，同時 Kang 博士亦和我討論有關美國的研究單位、政府部門和食品產業界對於分子生物技術應用的看法和實務情形；接下來的參訪地點是美國華盛頓州衛生局公共衛生實驗室 (Washington State Department of Health Public Health Laboratory)，主要研習內容為美國華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫 (The Shellfish Safety Program) 和美國疾病管制局食因性病原菌實驗室分子分型即時監測網 (The PulseNet USA) 兩項大型食品衛生安全監視計畫。生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫使用即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Real-Time Polymerase Chain Reaction ; Real-Time PCR) 作為生鮮貝類海鮮中腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的定量檢驗方法，檢驗結果應用在華盛頓州貝類海鮮養殖區的管理，進而保障民眾食用生鮮貝類海鮮的衛生安全；而食因性病原菌實驗室分子分型即時監測網則是利用標準化脈衝式電泳技術 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; PFGE)，將散發性的食因性病原菌菌株進行分子分型 (Molecular Subtyping)，再利用網際網路與核酸指紋圖譜資料庫比對分析，瞭

解是否為一群聚型的食物中毒案件，進而將遭受污染的食品回收，降低疫情的規模，減少社會成本的付出。

本次研習內容旨在經由與專家學者的經驗分享、和觀摩實驗室實際運作模式，瞭解美國分子生物技術應用在食品檢驗之現行實務與未來發展性，並取得為美國官方認可和學界肯定的試驗方法之標準作業程序書，作為本局微生物學實驗室的參考。

三、 研習行程

訓練進修日期及時間	訓練進修地點	實際訓練進修機構及訪談對象	訓練進修目的及討論主題
12/11,2005	台北－普爾曼	往程	
12/12-12/30, 2005	普爾曼	<ol style="list-style-type: none"> 華盛頓州立大學食品科學暨人類營養學研究所 Dr. Dong-Hyun Kang Mr. Peter Gray Miss Su-Sen Chang Miss Wendy Wu Miss Yelena Shukoehkino 華盛頓州立大學生物系統工程學研究所 Miss Wendy Wu 	<ol style="list-style-type: none"> 討論美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫 觀摩 Sagiene® Corporation 研發之沙門氏桿菌快速 PCR 檢測方法的驗證 觀摩小型屠宰場的環境監測（現場採樣） 觀摩牛隻和羊隻屠體的衛生監測（現場採樣、總生菌數、大腸桿菌群最確數、致病性大腸桿菌 O157:H7、沙門氏桿菌、曲狀桿菌和李斯特菌） 參觀生物系統工程學研究所和觀摩食品工業用加熱法之微生物驗證
12/31,2005	普爾曼－薛爾萊	移動	
1/1-1/2,2006	薛爾萊	新年假期	
1/3-1/6,2006	薛爾萊	<ol style="list-style-type: none"> 華盛頓州政府衛生廳公共衛生實驗室 Dr. Romesh K. Gautom 環境科學實驗室 Mr. Michael G. McDowell Mr. Eric Thompson Mr. Brian Hiatt Ms. Brenna Hartle Ms. Melanie Panoke 微生物學實驗室 Dr. Jinxin Hu Ms. Kaye Eckmann Ms. Jennifer Breeze Mr. Denny Russell 	<ol style="list-style-type: none"> 觀摩華盛頓州政府衛生廳甲殼類海鮮食品安全計畫之執行和問題討論（腸炎弧菌分子生物學檢驗法和海水的衛生監測） 美國國家食因性疾病分子分型監視網（PulseNet USA）西部區域實驗室觀摩和討論（以沙門氏桿菌和大腸桿菌 O157:H7 為例） 綜合討論
1/7-1/8,2006	薛爾萊－台北	返程	

貳、研習過程

經過 11 個小時跨越太平洋的飛行，終於抵達美國華盛頓州西塔國際機場（Sea-Tac International Airport），準備轉機飛往華盛頓州立大學主校區所在地普爾曼（Pullman），從轉機櫃台處的落地窗玻璃往外看，蔚藍的天空和耀眼的陽光印入眼簾，心想真是幸運！由於正值美國嚴冬時節，美國國內的小型機場常因跑道積雪或是風雪太大導致機場關閉，繼而更改飛機降落地點或是取消飛機航班。赴美前，準備下榻的旅館人員一再告知我，若是更改降落地點為斯波坎（Spokane）機場，一定要事先電話通知他們，原因是旅館至普爾曼機場僅需時 20 分鐘，而旅館至斯波坎機場單程便需花費 75 分鐘，還好今日陽光普照，應該會按照既定的飛行路線至普爾曼機場降落。話雖如此，心裏仍舊忐忑不安，而且不知何故，在等待轉機的過程中，登機門就更動了 3 次，還好降落機場仍舊是普爾曼。4 小時的漫長等待後，終於要登機了，步下航站走進停機坪，刺骨的冷氣襲來，這陽光真是騙人的。隔日 12 月 12 日晨間九時，赴美國華盛頓州立大學食品科學與人類營養學研究所 230 研究室與 Kang Dong-Hyun 博士見面。

一、參訪華盛頓州立大學食品科學與人類營養學研究所（Washington State University Department of Food Science and Human Nutrition）Kang Dong-Hyun 博士研究室

Kang Dong-Hyun 博士是韓國人，2000 年起受聘於食品科學與人類營養學研究所任教，他的研究領域包括：研發食因性病原菌的快速偵測系統、發展食因性病原菌的選擇性培養基、受傷的食因性病原菌其生存機制的研究等，目前最有興趣的細菌是坂崎腸桿菌（*Enterobacter sakazaki*）和 *Alicyclobacillus acidoterrestris*，Kang 博士亦專長於危害分析重要管制點（Hazard Analysis and Critical Control Point；HACCP）。他還是下列數本食品微生物專業期刊的編輯：*Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*、*Journal of Applied Microbiology*、*Letters in Applied Microbiology*、*Journal of Food Protection* 和 *Food Science and Biotechnology*。此外，Kang 博士也主持一個食品安全衛生相關資訊的網站，網址是：<http://safefood.wsu.edu>。

Kang 博士的研究生來自美國本土，還有韓國和台灣兩地，韓國藥物食品檢驗局的公務人員亦常選擇此處作為其博士後研究的地點，目前來自台灣的博士

研究生有兩位：一位畢業於國立中興大學食品暨應用生物科技學系，另外一位則畢業於國立台灣大學園藝學系，可惜我照訪的時機正好是學校的期末考週，學生們大多在圖書館裏溫習功課，Kang 博士告訴我隔週他們兩人都要飛回台灣去享受假期了。

與 Kang 博士會面後，他先向我說明，因為正值期末考和寒假期間，許多課程都已結束，研究室的部分實驗亦因研究生放假而暫停，不過他仍舊竭力安排我在這裡的行程：第一週，觀摩 Sagiene® 生物科技公司研發之沙門氏桿菌快速分子生物檢測方法的驗證；第二週，觀摩牛隻和羊隻屠體的衛生監測以及小型屠宰場的環境衛生監測；第三週，參觀生物系統工程學研究所並觀摩工業用加熱法的微生物驗證。此外，有關此行的研習主題：「分子生物技術在食品檢驗上之應用」，因為 Kang 博士曾經在美國農業部研究單位任職，經我簡略介紹台灣食品檢驗上應用分子生物技術的現況後，他推薦我去瞭解美國農業部主辦的生鮮蔬果微生物監視計畫（Microbiological Data Program），將有助於我認識分子生物技術與以往不同的角色和任務。



圖一：華盛頓州立大學食品科學
與人類營養學研究所外觀



圖二：華盛頓州立大學食品科學
與人類營養學研究所內部

二、分子生物技術在食品檢驗上之應用（一）— 美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫（Microbiological Data Program）

生鮮蔬果可經由田間栽種、採收、加工過程（清洗、分類、包裝與冷藏等）和運送過程中感染病原菌，已開發國家如美國、加拿大和日本等都曾經發

生因食用經腸出血型大腸桿菌 O157:H7 污染或是經沙門氏桿菌污染的生鮮蔬果造成食物中毒的事件。2001 年美國農業部為建立美國國內市售生鮮蔬果有關微生物污染的資料，指派所屬之農業市場處（U.S. Department of Agriculture's Agriculture Marketing Service；USDA-AMS）主辦此一監視計畫，此計畫旨在收集衛生指標菌和病原菌存在生鮮蔬果內之基本資料，提供美國農業部對生鮮蔬果導致食物中毒之可能性作風險評估，進而協助聯邦政府和州政府對生鮮蔬果衛生安全政策之擬定，和提供產業界執行 HACCP 的科學依據。農業市場處邀集同屬農業部的農業統計處（National Agricultural Statistics Service；USDA-NASS）、農業研究處（Agricultural Research Service；USDA-ARS）、食品安全檢驗局（Food Safety and Inspection Service；USDA-FSIS）以及美國食品藥物檢驗局（U.S. Food and Drug Administration；USFDA）和美國疾病管制局（U.S. Centers for Disease Control and Prevention；USCDC）共同協助參與籌備，設計符合統計理論的採樣計畫、選擇具監測代表性的生鮮蔬果種類、選定監測重要病原菌、證明實驗方法的確效、建立標準作業程序書、資料統計和分析等，使足以獲得具科學性和代表性的結果。

1. 監測生鮮蔬果樣品：羅馬甜瓜（Cantaloupe）、萵苣（Leaf and Romaine Lettuce）、蕃茄（Tomatoes）、苜蓿芽（Alfalfa Sprouts）、綠洋蔥（Green Onions）、荷蘭芹（Parsley）和胡荽（Cilantro）等，這 7 種生鮮蔬果符合全美高消費量、可生食性和曾造成食物中毒案例的三項條件。
2. 病原菌種類：
 - i. 病原性大腸桿菌（Pathogenic *E. coli*）：大部分的大腸桿菌是無害且生長在健康人的腸道中，可提供人體所需的維生素 B12 和維生素 K。但是有小部分的大腸桿菌菌株會使人致病，這些菌株被稱為病原性大腸桿菌，主要分為 6 種亞型（Subgroups），包括腸毒素型大腸桿菌（Enterotoxigenic *E. coli*；ETEC）、腸病原型大腸桿菌（Enteropathogenic *E. coli*；EPEC）、腸出血型大腸桿菌（Enterohemorrhagic *E. coli*；EHEC）、腸侵襲型大腸桿菌（Enteroinvasive *E. coli*；EIEC）、腸內附著型大腸桿菌（Enteroadherent aggregative *E. coli*；EAggEC）和棲息性大腸桿菌（"attaching and effacing" *E. coli*），各種病原性大腸桿菌的致病機

制、血清型別、臨床症狀和流行病學方面並不相同。依據美國疾病管制局的統計資料，病原性大腸桿菌在美國逐年引起重視，而依據我國疾病管制局的統計資料，病原性大腸桿菌所引起的食物中毒案例並不多見，但是大多數的學者和文獻均認為係因為台灣的官方實驗室對於病原性大腸桿菌的檢驗技術並不嫻熟，尤其病原性大腸桿菌的特性常與作為衛生指標菌的糞便型大腸桿菌的特性不同，未能正確地篩選出病原性大腸桿菌所致。

- ii. 腸出血型大腸桿菌 O157:H7：目前大腸桿菌之體抗原（Somatic O Antigen）約有 173 種，而鞭毛抗原（Flagellar H Antigen）約有 60 種，腸出血型大腸桿菌 O157:H7 對熱敏感，適宜在 10°C 至 42°C 生長，超過 45.5°C 即停止生長，而加熱至 75°C 持續 1 分鐘便死亡。一般傳統分離大腸桿菌方法有 44.5°C 分離培養步驟，而腸出血型大腸桿菌 O157:H7 在 44.5°C 生長不佳，這是導致腸出血型大腸桿菌 O157:H7 分離率不高的原因之一。美國農業部規定，漢堡肉中心溫度需達到 76.6°C 才可確保食用安全，但是此菌可在冷凍漢堡肉內生存良好，只要食入 100 隻菌量即會被感染致病，病情嚴重的患者會死亡。依據美國農業部對絞肉中腸出血型大腸桿菌 O157:H7 監視計畫報告結果：2003 年檢測 6,584 件樣品，陽性結果有 20 件；2004 年檢測 8,010 件樣品，陽性結果有 4 件；2005 年檢測 10,975 件樣品，陽性結果有 19 件。1996 年日本曾發生因食用遭受腸出血型大腸桿菌 O157:H7 污染的蘿蔔芽而有 6000 多人食物中毒的案例。現今美國、加拿大和日本等國，每年或隔年都會發生因食用污染腸出血型大腸桿菌 O157:H7 的漢堡、蘋果汁、生乳和水的食物中毒案例，台灣至今尚未發生腸出血型大腸桿菌 O157:H7 的案例，但是曾經在食品檢體中分離出大腸桿菌 O157，以聚合酶鏈鎖反應測試 Verotoxin 毒素基因，其結果為陰性。
- iii. 沙門氏桿菌（*Salmonella*）：沙門氏桿菌一般分佈遍及自然界，無論是土壤、水體、昆蟲、野生動物、家禽、家畜、水產品、農產品，甚至是健康人和其居住環境都可以培養出此菌，尤其是急宰病豬的沙門氏桿菌檢出率可高達 65%，而帶原沙門氏桿菌的蛋雞，其所生的雞蛋帶有沙門氏桿菌的機率則高達 100%。沙門氏桿菌的生命力較強，對

外在環境具一定的抵抗力，在冰凍的土壤中可存活數月，在糞便中可存活 2 個月，甚至醃肉製品內亦可存活 75 天。沙門氏桿菌對熱亦有抵抗力，70°C 加熱 5 分鐘、60°C 加熱 15-30 分鐘或是 55°C 加熱 60 分鐘，方可將其殺死。目前已發現有超過 2000 種血清型的沙門氏桿菌會感染人類，而造成人類食物中毒症狀的沙門氏桿菌是鼠傷寒沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 和腸炎沙門氏桿菌 (*Salmonella enteritidis*)。依據我國疾病管制局的統計資料 (1996-2002)，沙門氏桿菌位居國內細菌性食物中毒案例病原菌第 4 名。

3. 州政府農業廳和所屬實驗室：華盛頓州 (Washington State)、加州 (California State)、科羅拉多州 (Colorado State)、佛羅里達州 (Florida State)、馬里蘭州 (Maryland State)、密西根州 (Michigan State)、明尼蘇達州 (Minnesota State)、紐約州 (New York State)、俄亥俄州 (Ohio State)、德州 (Texas State) 和威斯康辛州 (Wisconsin State) 負責執行採樣計畫和微生物檢驗，而馬里蘭州和德州政府農業廳僅參與採樣計畫，再將生鮮蔬果樣品分別送至美國農業部國家科學實驗室與俄亥俄州政府農業廳所屬實驗室進行後續微生物檢驗。
4. 聯邦政府所屬實驗室：美國農業部國家科學實驗室 (U.S. Department of Agriculture's National Science Laboratory; USDA-NSL) 負責微生物檢驗，美國農業部獸醫中心 (U.S. Department of Agriculture's Center for Veterinary Medicine; USDA-CVM) 負責陽性菌株的抗生素敏感性試驗 (Antimicrobial Resistance) 和核酸指紋圖譜分子分型 (PFGE Molecular Typing)。
5. 研究機構：賓州州立大學腸胃疾病中心 (Gastroenteric Disease Center at Pennsylvania State University) 負責病原性大腸桿菌陽性菌株血清型 (Serotyping) 鑑定和 13 種毒素基因鑑定，維吉尼亞州共同實驗室 (Commonwealth of Virginia Division of Consolidated Laboratories Services; DCLS) 負責改良和研發微生物試驗方法。



圖三：美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫參加實驗室

摘錄自 2005 年度報告書

6. 微生物試驗方法：自 2001 年監視計畫開始執行，計畫團隊內的微生物學專家和學者便持續評估試驗方法，依據年度所獲得的結果不斷修正試驗方法甚或改良新的試驗方法，達到更快速、更靈敏和更準確的目的。
 - i. 大腸桿菌試驗方法：2001 年計畫初期採用傳統乳糖發酵產氣篩選檢驗法，2004 年變更採用 AOAC 公定方法第 992.30 號 ColiComplete[®] 酵素篩選檢驗法，自動微生物鑑定儀 VITEK 確認。
 - ii. 病原性大腸桿菌篩檢試驗方法：2005 年起以（Multiplex PCR）的檢驗方法，檢測毒素基因 Shiga-toxins（Stx-1、Stx-2）、Heat labile toxin（LT-1）和 Heat labile toxins（STa、STb）用以篩檢病原性大腸桿菌。
 - iii. 腸出血型大腸桿菌 O157:H7 篩選試驗方法：2005 年起使用杜邦公司製造的自動聚合酶鏈鎖反應儀 BAX 篩選試驗，自動微生物鑑定儀 VITEK 和 FDA-BAM 之方法確認。

- iv. 沙門氏桿菌篩檢試驗方法：2005 年起使用杜邦公司製造的自動聚合酶鏈鎖反應儀 BAX 篩選試驗，自動微生物鑑定儀 VITEK 確認。
 - v. 菌株分離培養：仍沿用傳統培養方法，但是腸出血型大腸桿菌 O157:H7 使用免疫磁珠技術（Immunomagnetic Separation）增進檢出率。
7. 品質管理：包括建立採樣、檢驗方法和報告標準作業程序、提供陽性和陰性標準品管菌株、執行能力試驗計畫等。
8. 發表年度報告書：生鮮蔬果微生物監視計畫係為一持續型的計畫，自 2001 年迄今，每年均會發表年度報告書，以下為 2005 年度報告書內容：
- i. 生鮮蔬果樣品數量：11,513 件。
 - ii. 大腸桿菌篩檢數量：11,508 件。
 - iii. 病原性大腸桿菌篩檢數量：4,150 件。
 - iv. 病原性大腸桿菌篩檢陽性結果：48 件。
 - v. 病原性大腸桿菌陽性分離菌株：9 株。
 - vi. 腸出血型大腸桿菌 O157:H7 篩檢數量：11,511 件。
 - vii. 腸出血型大腸桿菌 O157:H7 篩檢陽性結果：12 件。
 - viii. 腸出血型大腸桿菌 O157:H7 陽性分離菌株：0 株。
 - ix. 沙門氏桿菌篩檢數量：11,512 件。
 - x. 沙門氏桿菌篩檢陽性結果：47 件。
 - xi. 沙門氏桿菌陽性分離菌株：6 株。

今年（2006）生鮮蔬果微生物監視計畫預計將另一種常造成人類食物中毒的志賀氏桿菌（*Shigella*）納入監測中，維吉尼亞州共同實驗局（DCLS）正在研發利用即時聚合酶鏈鎖反應儀（Real-Time PCR）檢驗 4 種志賀氏桿菌（*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella boydii* 和 *Shigella sonnei*）的檢驗技術並評估其檢驗能力。

Kang 博士告訴我：2003 年 10 月美國農業部食品安全檢驗局便已公告 BAX 自動聚合酶鏈鎖反應儀作為屠體、生肉、禽畜肉產品、即食肉品和蛋類產品檢測沙門氏桿菌的篩選檢驗方法；2005 年 3 月公告 BAX 自動聚合酶鏈鎖反應儀作為紅肉、禽肉、蛋類產品和環境檢體檢測李斯特桿菌的篩選檢驗方法；2005 年 10 月公告 BAX 自動聚合酶鏈鎖反應儀作為牛絞肉和碎牛肉製品檢測出血型

大腸桿菌 O157:H7 的篩選檢驗方法；加上在生鮮蔬果微生物監視計畫作為生鮮蔬果檢測沙門氏桿菌和腸出血型大腸桿菌 O157:H7 的篩選檢驗方法，表示美國農業部已將分子生物技術視為病原菌的公告篩選檢驗方法，取代了傳統培養技術和免疫抗體技術作為篩選檢驗的角色。雖然如此，Kang 博士表示目前仍有專家學者對於分子生物技術作為篩選檢驗方法存有疑慮，像是生物晶片仍只適用於學術研究領域而非實務領域，但是他認為自動聚合酶鏈鎖反應儀未來的發展，將會同時擔負起作為篩選檢驗和毒素基因鑑定等雙重任務。

三、觀摩 Sagiene[®] Corporation Inc.研發之沙門氏桿菌快速分子生物檢測方法的驗證

Sagiene[®] Corporation Inc.是一家總部位於華盛頓州西雅圖市的生物科技公司，主要以研發檢測 DNA 為主的檢驗技術，應用範圍包括醫學、植物、環境與食品工業領域。Sagiene[®] Corporation Inc.的 Yelena Shubochkino 小姐是俄國人，前幾年移民到美國，目前在 Sagiene[®]負責研發的工作。Yelena 告訴我有名廠牌的自動聚合酶鏈鎖反應儀是較昂貴的儀器，是放在規劃良好的實驗室裏，由專業技術人員操作，然而美國有無數間小型食品加工廠無法負擔這樣的成本，Sagiene[®]實驗設計是朝向成本經濟、易於操作為目的。今年和 Kang 博士研究室合作，共同驗證新開發應用在牛絞肉中沙門氏桿菌的分子生物檢測方法。

檢測方法的步驟是將 25g 的牛絞肉中各加入已知數量分別為 0、10、100、1000 隻的沙門氏桿菌，預培養 3 小時後經離心過程取得濃縮菌液，利用聚合酶鏈鎖反應複製大量的沙門氏桿菌核酸片段，偵測標的物係為嵌入核酸片段的螢光物質 EvaGreen，可檢下限達每公克牛絞肉中小於 10 隻沙門氏桿菌。這個方法僅使用小型的儀器：小型離心機、24 反應孔的聚合酶鏈鎖反應儀和比色計，預培養時間由傳統 18 至 24 小時減少至 3 小時，確實是省時省力。

Kang 博士的博士班研究生 Su-sen 和 Yelena 兩人重複操作實驗，驗證實驗方法的可檢下限，可惜結果並不盡理想，多次驗證的結果未能達到可檢下限要求，Yelena 表示要將結果帶回公司與主管討論，待新年過後再接再勵。

Kang 博士表示分子生物技術的應用非僅供中央型實驗室，很多的小型肉品工廠只需要簡單又快速的檢驗儀器，偵測極限達到美國農業部的衛生標準，作為肉品的品質管制即可。

四、觀摩小型屠宰場的環境、牛隻和羊隻屠體的衛生監測

12月19日星期一，早上走在校園裏就覺得人煙稀少，連行駛市區往返校園的公車也減少班次，因為華盛頓州立大學已經開始放假了，美國學生大多數回家過節，國際學生則是結伴去渡假，還好Kang博士研究室的助理Peter Gray先生依舊準時上班。Peter這星期要去位於愛達荷州莫斯科市（Moscow）的兩家小型屠宰場採樣：一家屠宰場作環境衛生監測，另一家則是屠體（Carcasses）的衛生監測。愛達荷州莫斯科市原來是愛達荷大學（University of Idaho）的所在地，也是Peter的母校，既然在前往屠宰場的途中會經過母校，Peter就義不容辭地進入愛達荷大學為我作一番校園巡禮，雖然愛達荷大學校區沒有華盛頓州立大學校區廣闊，但是有這樣熱心的校友，仍然對愛達荷大學留下美好的印象。小型屠宰場的環境衛生監測是使用無菌棉棒（Swab sample）針對屠宰過程的相關器械採樣，而牛隻和羊隻屠體的衛生監測則是使用無菌海棉（Sponge sample）擦拭屠體表面，然後將樣品攜回實驗室，使用3M產品檢測衛生指標菌：生菌數、大腸桿菌群和大腸桿菌，傳統培養法搭配乳膠顆粒凝集法和生化反應檢測病原菌：沙門氏桿菌、腸出血型大腸桿菌 O157:H7、李斯特菌和彎曲桿菌（*Campylobacter* spp.）。



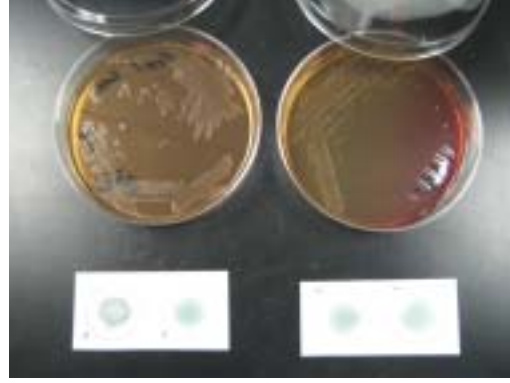
圖四：無菌棉棒擦拭相關器械



圖五：無菌海棉擦拭屠體表面



圖六：Peter Gray 示範實驗



圖七：疑似菌落進行乳膠凝集法

五、參觀生物系統工程學研究所和觀摩食品工業用加熱法之微生物驗證

這星期剛好銜接聖誕節和新年假期，學校裡的職員都選這時後休假，Peter 也休假了，Kang 博士的碩士班研究生 Wendy 想要在夏季如期畢業，年假就留下來繼續作實驗。因為 Kang 博士是食品微生物學者，所以很多食品科學的研究計畫需要 Kang 博士的協助參與，她的碩士論文便是與生物系統工程學研究所的教授合作。生物系統工程學研究所研發新式食品工業用的加熱法應用在食品工業產品去除病原菌，保證食品的安全衛生，這些加熱法大多屬於紅外線加熱、微波加熱或是混合兩種加熱法的應用，Wendy 負責選擇適宜的菌株孢子如 *Clostridium sporogenes* 的孢子，和建立試驗步驟作為加熱法之驗證。Wendy 除了示範了厭氧培養法和加熱方法驗證實驗外，還帶我去參觀生物系統工程學研究所的實驗工廠，那裡有各式各樣應用在食品工業滅菌用的大型儀器，而 Wendy 卻告訴我，這些都還只是儀器雛型，實際應用在食品工業用的加熱設備是眼前儀器雛型的數倍至十倍以上，真是令我大開眼界。

時間悄悄地流逝過去，在華盛頓州立大學的研習已進尾聲，很感謝 Kang 博士的協助和指導，雖然在冬季假期中造訪會有些許遺憾，但仍然獲益良多。Kang 博士學養豐厚，在區區數星期便讓我瞭解美國農業部應用分子生物技術的現況，Kang 博士慨然應允我日後若遇上任何食品微生物相關難題，都可以透過電子郵件和他討論，並表達有機會能來台灣訪問。



圖八：食品工業用加熱儀器雛型(一) 圖九：食品工業用加熱儀器雛型(二)

六、參訪華盛頓州政府衛生廳公共衛生實驗室（Washington State Department of Health Public Health Laboratories）

從位於華盛頓州東部的普爾曼市，越過中部的高山，來到了西部的西雅圖市，天空正下著毛毛細雨，在這裡住了一星期後，發現天天都是陰雨綿綿，幾乎沒有看到太陽露過臉，聽當地人說這正是西雅圖市典型的天氣，一年 365 天有 250 天是陰天，而在冬季則多是陰雨天，大家都習慣了，所以下雨天都不撐雨傘，只有像我這種剛來的訪客才會隨身帶雨傘，華盛頓州東西兩邊的天氣還真是天壤之別。1 月 3 日星期二，新年假期結束，準時抵達華盛頓州政府衛生廳公共衛生實驗室，拜訪公共衛生微生物學實驗室的主管 Hu Jixin 博士，Hu 博士是華人，來自加拿大，專長在在微生物學，她先歡迎我來實驗室參訪，並向我簡單介紹了公共衛生實驗室的組織和任務以及我在這裡的研習行程：1 月 3 日至 4 日參訪環境科學實驗室，研習貝類海鮮腸炎弧菌分子生物檢驗和海水微生物檢驗，這兩項檢驗結果主要應用在華盛頓州貝類海鮮衛生安全監視計畫；1 月 5 日至 6 日參訪公共衛生微生物學實驗室，觀摩標準化脈衝式電泳技術的實際操作和 DNA 指紋圖譜資料庫比對作業，這是應用在美國食因性病原菌實驗室分子分型監視網。

華盛頓州政府衛生廳共有六個部門，公共衛生實驗室是隸屬於流行病學、衛生統計暨公共衛生實驗室部門（Division of Epidemiology, Health Statistics and Public Health Laboratories, EHSPHL），早在 1900 年代初期華盛頓州政府便於西雅圖市區設置公共衛生實驗室，執行美國聯邦政府和華盛頓州政府有關健康促

進和環境衛生等公共衛生議題相關的監視計畫和公共衛生政策評估計畫等，直到 1985 年遷於現址，離西雅圖市區北方約 10 哩遠，名為薛爾萊（Shoreline）的城市，並擴大服務範圍和對象，包括對州內各級臨床醫學實驗室和環境衛生實驗室的諮詢、教育訓練和品質管理等服務，除此之外，亦協助華盛頓州政府公共衛生政策之制定。現任實驗室主管 Gauton 博士係於 2001 年接任此主管職位，是一位分子流行病學者（Molecular Epidemiologist）專長在發展分子生物技術，建立快速檢驗方法用以監測或評估病原菌對公共衛生相關議題之影響，Gauton 博士曾改進並建立標準化脈衝式電泳技術（Pulsed-Field Gel Electrophoresis；PFGE）使其能在 24 小時內獲知結果，成功地應用在疫情的判定和控制，得以推動食因性病原菌實驗室分子分型監視網（The PulseNet）的順利進行。公共衛生實驗室又可細分為 4 個實驗室，分別是：

1. 環境科學實驗室（Office of Environmental Laboratory Sciences），約有 30 位實驗人員，主要專長在環境微生物學和環境化學及放射線學，接受各種環境檢體、食品、貝類海鮮等檢驗危害物質的定性或定量檢驗，該實驗室已通過美國環保署（EPA）、美國食品藥物管理署（FDA）、美國病理學會（CAP）和美國放射線管理委員會（Nuclear Regulatory Commission）等單位之檢測能力認證；環境科學實驗室亦為華盛頓州化學性戰劑應變諮詢中心（Chemical Terrorism Response）。
2. 公共衛生微生物學實驗室（Office of Public Health Microbiology），約有 30 位實驗人員，主要專長在食品微生物學和臨床微生物學，包括食品中毒原因菌、臨床重要病原菌和病毒等之分離培養、血清學檢驗和分子生物學檢驗等。該實驗室更致力於分子生物學檢驗方法的開發，提供快速鑑定病原菌的服務，此外，該實驗室亦是最早加入美國食因性病原菌實驗室分子分型監視網（PulseNet USA）的實驗室之一。
3. 新生兒先天性疾病篩檢實驗室（Office of Newborn Screening），約有 25 位實驗人員，主要專長在新生兒先天代謝異常之篩檢，包括苯酮尿症（Phenylketonuria）、先天性甲狀腺低能症（Congenital Hypothyroidism）、先天腎上腺增生（Congenital Adrenal Hyperplasia）、半乳糖血症（Galactosemia）等，該實驗室每年平均對 150,000 件樣本執行 670,000 項篩檢試驗。

4. 作業管制辦公室（Office of Laboratory Operations and Technical Support），約有 20 位技術人員和工作人員，主要負責整個公共衛生實驗室的行政管理、品質管理和教育訓練等作業。



圖十：公共衛生實驗室外觀(一)



圖十一：公共衛生實驗室外觀(二)

聽完胡博士對公共衛生實驗室的詳細介紹後，我就展開研習的腳步，先來到環境科學實驗室和資深微生物學家 Eric Thompson 先生會面，Eric 介紹另兩位成員 Brian Hiatt 先生和 Brenna Hartle 小姐，他們三位一起負責貝類海鮮中腸炎弧菌之分子生物檢驗，和其他突發性疑似食物中毒案例中食品病原菌的檢驗。首先，Eric 為我介紹美國華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫：

七、分子生物技術在食品檢驗上之應用（二）－ 美國華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫（The Shellfish Safety Program）

人類利用火來烹煮食物的歷史，可回溯至遠古時代，熟食文化應是人類文明的象徵之一，然而可能是遠古祖先的基因作祟，現代文明人仍存有生食的習性，如日本人和台灣人嗜吃生魚片，歐美人士則是嗜食生蠔。而這些軟體貝類除了生食外，為了保持原味，也僅作最低鮮度的的烹調。然而貝類海鮮是屬於濾食性動物，會將海洋中生存的病原菌或是會產生毒素的藻類濃縮在腸道中，經由食用這些含有毒藻類和病原菌的貝類海鮮，非常容易造成食物中毒。華盛頓州位於美國西北角，西面濱臨太平洋，其乾淨的海灣和河口使其成為生蠔、象鼻蚌、奶油蛤和淡菜等軟體貝類的著名產區，在西雅圖市的海港邊，連綿坐落許多大大小小的海鮮餐廳，主廚推薦的都是華盛頓州自產的生蠔大餐，尤其在夏季，氣候宜人，非常多的觀光客來這裡大快朵頤。此外，華盛頓州普捷灣

(Puget Sound) 和海岸區 (Costal) 都有觀光貝類海鮮養殖區，提供當地人全家大小共同參與挖掘貝類海鮮的樂趣，更由於華盛頓州是全美數一數二的貝類海鮮產區，經由便捷的配送系統，全美都可以嚐到華盛頓州產的生蠔，因此生鮮貝類海鮮的衛生安全受到華盛頓州政府高度的重視，也由於華盛頓州政府的努力，華盛頓州被視為全美最安全的貝類海鮮養殖區之一。



圖十二：華盛頓州貝類海鮮養殖區

摘錄自 2004 年度報告書

美國華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫主要分為多項子計畫，由華盛頓州數個州政府部門如衛生局、環境保護局和民間自然保育協會等共同參與和執行，主要包括：

1. 營業貝類海鮮養殖區的監測與分類 (Definitions and Process for Classifying Commercial Shellfish Growing Areas)：利用定期性海岸線污染源的巡查、海水的微生物品質監測、海洋性生物毒素的監測和海潮與海流評估等方式，將州內所有的貝類海鮮養殖區分為核准養殖區 (Approved Areas)、條件性核准養殖區 (Conditionally Approved areas)、限制性養殖區 (Restricted Areas) 和禁止養殖區 (Prohibited Areas) 四種等級。只有核准養殖區和條件性核准養殖區的貝類海鮮可以在採收後直接進入消費市場上販售，限制性養殖區因為其海水品質指標菌糞便型大腸桿菌群 (Fecal Coliform Bacteria) 含量較高於監測標準，所以此區養殖的貝類海鮮需在採

收後轉運至核准養殖區進行約需數星期至數月的淨化過程，始可以進入消費市場上販售。禁止養殖區的定義係指養殖區的衛生品質監測值不佳，如糞便型大腸桿菌群、病原菌和海洋性生物毒素等，或是靠近汙水處理廠和碼頭區的區域都屬於禁止養殖區，此外，未經衛生局評估過的區域亦屬於禁止養殖區。以 2004 年的資料為例，華盛頓州總計有 95 座營業貝類海鮮養殖區，佔地 200,000 公畝，88 座屬於核准區，15 座條件性核准區和 6 座限制性核准區，而少部分養殖區會有一種以上的分類。

2. 營業貝類海鮮養殖區的認證與貝類海鮮營業商營業執照的發放（Licensing and Certification Program）：對於養殖區的管理除了進行養殖區的監測和分類外，還發放認證證書（Harvest Site Certificates），養殖區證書有效期限為一年，每年定期換發證書。除此之外，對於營業商的工廠進行衛生安全查核，發給合格營業商營業執照（Operation Licenses），有效期限亦為一年，每年定期換發營業執照，目前總計發放 331 張營業執照。
3. 觀光貝類海鮮養殖區的監測（Recreational Shellfish Program）：主要目的是提供一般民眾有關觀光養殖區的即時資訊，當民眾決定要去養殖區大小同樂時，能獲得足夠資訊決定前往的時間和區域，避免生物性危害的發生。
4. 海洋性生物毒素監視計畫（Marine Biotxin Monitoring Program）：定期監測海水中麻痺性貝類毒素（Paralytic Shellfish Poison；PSP）、失憶性貝類毒素（Amnesic Shellfish Poison；ASP）和腸炎弧菌耐熱性溶血素（Thermalstable Direct Haemolysin；TDH）的含量，作為管理貝類海鮮養殖區的依據。

除了上述子計畫外，還有普捷灣區域監視計畫（Puget Sound Ambient Monitoring Program）、貝類海鮮養殖區復育計畫（Shellfish Growing Area Restoration Program）、印地安區生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫（Tribal Shellfish Sanitation Program）等多項子計畫同時執行。

Eric 介紹完整個生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫的架構和內容後，再向我說明腸炎弧菌之分子生物檢驗是在 2004 年起正式應用在生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫，之前經過數年的建立標準檢驗技術，使用數十株標準菌株和臨床菌株確認方法的敏感性和專一性，並和傳統培養方法作比對，再經由公共衛生實驗室的技術審查委員會審核通過，才正式應用在實務上，目前已有兩年的實務

經驗。使用自動核酸萃取儀 MagNa Pure LC 搭配即時聚合酶鏈鎖反應儀 Gene Amp 7700 的最大優點是檢驗時間只需要 2-3 天即可獲知結果，對於監視計畫的進行幫助頗大，可惜的是，腸炎弧菌的檢驗是在每年的 5 月到 9 月進行，因此無法看到實際操作，但是有非常多的資料可提供給我參考，並且很樂易與我分享經驗，Eric 還建議我應該在夏季再來研習一次，這樣就有完整的理論基礎和實務經驗了。

腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是從一起發生在日本大阪市因食用海鮮所引發的食物中毒案例中被分離出來的菌種，目前是日本最常見的食物中毒原因菌，在台灣亦是位居國內食物中毒原因菌之首位，每年的 7、8 月是腸炎弧菌中毒案件的高峰期，冬天則較少發生。腸炎弧菌喜好生存在溫度穩定、有機質豐富和含有適當鹽分濃度的海洋、河口交匯處，其繁殖力相當強，但是不耐高、低溫，加熱至 60°C 持續 15 分鐘即死亡。在海水溫度變化較大的區域，腸炎弧菌的含量會有季節性的變化，當秋季海水溫度降至 13-15°C 時，腸炎弧菌會附著在浮游生物的外骨骼上，沉降至水底過冬，至隔年海水溫度回升後，再度隨著季節性水流四處分佈，形成季節性循環週期。

華盛頓州生鮮貝類海鮮中腸炎弧菌之監測是在每年 5 月至 9 月進行，先利用多階 3 管預培養 (Pre-culture)，再萃取腸炎弧菌 DNA，利用即時聚合酶鏈鎖反應儀檢測生鮮貝類海鮮中是否含有腸炎弧菌相關的基因片段與含量，這 4 個基因片段分別是屬於 16S ribosomal gene (250bp)、*gyr* gene (Gyrase B)、*tlh* gene (Thermolabile direct haemolysin) 和 *tdh* gene (Thermostable direct haemolysin)，並判定結果是否達到關閉貝類海鮮養殖區的衛生標準：每 0.1 公克的樣品中含有 5 CFU 腸炎弧菌的 *tdh* 基因片段含量 (*tdh* gene at a level of 5 CFU/0.1g)，這是依據美國各州貝類海鮮衛生安全聯合會議 (Interstate Shellfish Sanitation Conference; ISSC) 所達成的關閉貝類海鮮養殖區之行政命令。

第二天，Eric 介紹了 Melanie Panoke 小姐，Melanie 負責飲用水和海水微生物檢驗，海水中糞便型大腸桿菌群的檢驗結果是監視計畫中相當重要的指標和依據，檢驗方法係依據經美國環保署和美國藥物食品檢驗局核准的多管發酵法 (Multiple Tube Fermentation; MTF)，其結果用於營業貝類海鮮養殖區和觀光貝類海鮮養殖區的監測，並影響其分類等級。糞便型大腸桿菌群的監視標準為：良好 (每 100 毫升海水樣品中含有糞便型大腸桿菌群最確數值：0-30

MPN)、尚可(每 100 毫升海水樣品中含有糞便型大腸桿菌群最確數值: 31-43 MPN) 和不佳(每 100 毫升海水樣品中含有糞便型大腸桿菌群最確數值: >43 MPN)。Melanie 告訴我在 95 個營業貝類海鮮養殖區, 總計有超過 1200 個採水站, 以 2004 年為例, 全年總計樣品數量達到 10,000 件以上。



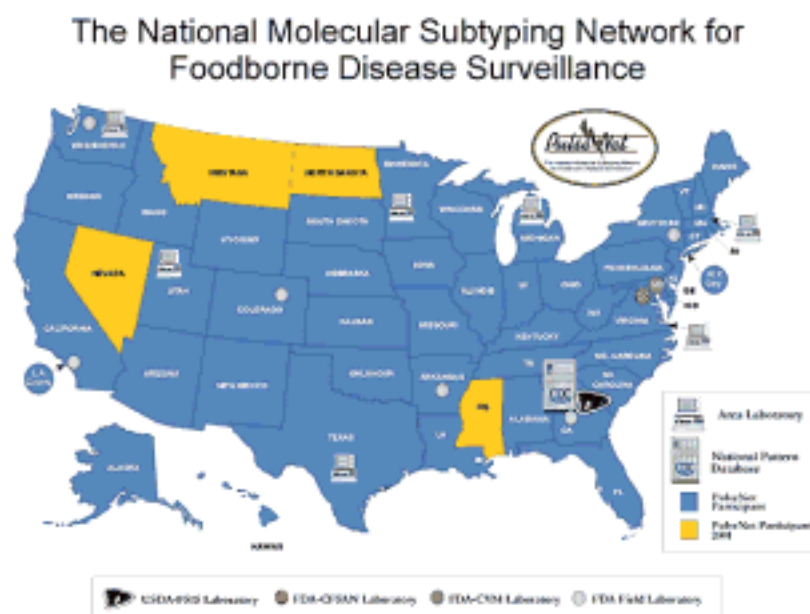
圖十三: Eric、Brian、Brenna 和我
在實驗室前留影

很感謝環境科學實驗室的 Eric Thompson、Brian Hiatt、Brenna Hartle 和 Melanie Panoke 的指導和協助。最後兩天, 我在公共衛生微生物學實驗室觀摩 Kaye Eckmann 小姐和 Jennifer Breeze 小姐實際操作標準化脈衝式電泳技術。

八、分子生物技術在食品檢驗上之應用(三) - 美國疾病管制局食因性病原菌實驗室分子分型即時監測網(The PulseNet USA)

1993 年 1 月美國華盛頓州西雅圖市發生一起食物中毒事件, 美國國內一家頗具規模的連鎖速食店-盒中傑克(Jack in the Box), 其在未注意的情況下, 販售受到腸出血性大腸桿菌 O157:H7 所污染, 且未經煮熟的牛肉漢堡給消費者食用, 導致 4 人死亡和 475 人食物中毒事件, 美國疾病管制局的研究人員當時採用脈衝式電泳技術建立各菌株的核酸指紋圖譜, 並比對從各州的食物中毒患者和牛肉漢堡所分離菌株的核酸指紋圖譜, 發現核酸指紋圖譜系為同源的分子型, 因而確立此次食物中毒案例的污染源是牛肉漢堡。鑒於脈衝式電泳分子分型技術成功地應用在時務上的經驗, 1995 年美國疾病管制局和美國公共衛生實驗室學會(Association of Public Health Laboratories; APHL)的研究人員共同合作, 建立對腸出血性大腸桿菌 O157:H7 脈衝式電泳技術的標準作業程序, 並由

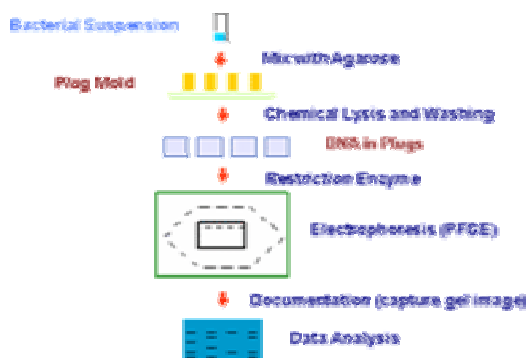
華盛頓州、德州、麻薩諸塞州和明尼蘇達州等四州衛生廳公共衛生實驗室執行，此即為食因性病原菌實驗室分子分型計畫的雛型。1996 年擴展到有 10 間公共衛生實驗室參與此項計畫，至 2000 年便已成為國家級計畫（PulseNet USA），除了美國疾病管制局和各州政府公共衛生實驗室參與外，還包括其他聯邦政府的實驗室：美國農業部的食品安全和檢驗實驗室（U.S. Department of Agriculture’s Food Safety and Inspection Service Laboratory；USDA-FSIS）、美國農業部的獸醫中心（U.S. Department of Agriculture’s Center for Veterinary Medicine；USDA-CVM）和美國食品藥物檢驗局的實驗室（U.S. Food and Drug Administration Laboratories in the Center for Food Safety and Applied Nutrition；FDA-CFSAN）。



圖十四：The PulseNet USA

PulseNet 的運作模式是區域負責實驗室如華盛頓州公共衛生實驗室，將負責區內的所有實驗室分離到的菌株集中，經由脈衝式電泳後可以獲得 DNA 指紋圖譜，實驗室技術人員再將 DNA 指紋圖譜利用電子郵件傳送到疾病管制局的資料庫中心，資料庫中心有專人負責進行比對分析，若發現有相同圖譜之菌株，立即通知各州公共衛生單位進行調查，疾病管制局流行病學專家也會視需要性，趕往當地協助調查。

1月5日早上和 Kaye 見面，她告訴我今日我們所要測試的沙門氏桿菌的菌株，是來自一起因食用未經巴斯德滅菌處理的乳製品所造成的疑似食物中毒案例，因為美國有部分消費者喜歡具有自然風味的食品，如未加工之食品或是輕度加工食品、不含食品添加物（如防腐劑）的食品、或是未經滅菌處理的食品等，然而這些食品是非常容易遭受到病原菌的污染，因而造成消費者食用後中毒。Kaye 先將純化的菌株調整至標準濃度，加入液態瓊脂後使其凝固，將菌株固定包埋在瓊脂膠塊內，加入蛋白質分解酵素破壞細菌的細胞壁和細胞膜，使位於細胞質內的 DNA 釋出，再加入特定核酸限制酶 *XbaI* 將菌株 DNA 分解成大小不一的 DNA 片段，將瓊脂膠塊切成一定的大小放入電泳膠片中，經由脈衝式電泳後可以獲得 DNA 指紋圖譜。



圖十五：脈衝式電泳（PFGE）原理圖示

雖然脈衝式電泳的原理簡單易懂，但是實驗需花費一整天的時間。第二天由 Jennifer 示範電泳膠片染色和照相，以及使用電腦軟體 BioNumerics 將 DNA 指紋圖譜標準化定位後，再與 DNA 指紋圖譜資料庫分析比對，並將 DNA 指紋圖譜傳送到疾病管理局的資料庫中心。Jennifer 表示，製作成功的 DNA 指紋圖譜非常重要，若是圖譜的品質不佳，如 Smear Band、Thick Band 或是 Curved Band 等情形發生，都會影響後續的圖譜分析，甚至無法比對分析，需要重新製作 DNA 指紋圖譜。此外，在進行圖譜分析時也要注意 Intensity Band 和 Light Band 等原因，以免作錯誤的判斷。



圖十六：與 Jennifer、Kaye 等人
合影



圖十七：與 Elizabeth 合影

Hu 博士告訴我美國食因性病原菌實驗室分子分型計畫是一個運作很成功的監視網，因為 PulseNet 的成效卓越，分別於 1999 年和 2002 年獲得美國政府所頒發的創新獎（Innovations in Government Award），這都要歸功於美國疾病管制局的學者專家組成的團隊，建立所有的標準化作業程序，包括使用標準菌株、標準操作程序、相同的電腦分析軟體等，還有定期舉辦實驗技術和電腦軟體應用的教育訓練課程，技術人員必須取得合格證書和通過能力試驗的考驗，美國疾病管制局同時設立專屬網站，提供大家新技術訊息，並讓大家討論工作上的技術問題，由於疾病管制局內各有專人負責特定病原菌的 PFGE 研發工作，大部份問題都能得到專業的解答。此外，每年還舉辦年會（PulseNet Annual Update Meeting），例如 2005 年便是由華盛頓州政府衛生局主辦第 9 屆年會，地點在西雅圖市，自 5 月 9 日至 11 日為期 3 日。更進一步，美國疾病管制局逐步推動此計畫邁向國際化，建立 PulseNet International：

1. 1999 年成立 PulseNet Canada，由 7 個省和 3 間國立實驗室共同參與。
2. 2004 年 9 月成立 PulsNet Europe，參與的國家包括：奧地利、比利時、保加利亞、塞浦路斯、捷克、丹麥、英格蘭、蘇格蘭、愛爾蘭、芬蘭、法國、德國、希臘、匈牙利、冰島、義大利、盧森堡、挪威、波蘭、葡萄牙、西班牙、羅馬尼亞、瑞士、瑞典和荷蘭。

3. 2004 年 3 月成立 PulseNet Asia，參與的國家包括：台灣、香港、中國、韓國、日本、印度、澳洲、紐西蘭、馬來西亞、菲律賓、泰國、越南和孟加拉。
4. 2004 年 7 月成立 PulseNet Latin America，參與的國家包括：巴西、阿根廷、玻利維亞、智利、哥倫比亞、哥斯大黎加、墨西哥、尼加拉瓜、巴拉圭、秘魯、烏拉圭和委內瑞拉等。



圖十八：PulseNet International

爲什麼要建立 PulseNet International 呢？因爲在世界貿易組織的運作下，商品的流通是無國界的，所以食品的衛生安全也需要各國來共同維護。例如 2004 年 2 月 17 日位於日本沖繩縣發生一起因食用腸出血性大腸桿菌 O157:H7 污染`的漢堡而導致食物中毒的案例，醫院通報沖繩縣立衛生環境局，一位幼童因腹痛、發燒和血便症狀住院，糞便檢體經細菌培養爲腸出血性大腸桿菌 O157:H7 陽性，經衛生環境局的流行病學家向家屬作問卷調查和分析，感染源應是 2 月 6 日所食用的漢堡肉，而且除了住院的幼童外，全家人都食用了漢堡肉，家庭中的另一位幼童也有輕微不適，但沒有住院治療。衛生環境局取得剩餘的漢堡肉和所有家屬的糞便檢體，經由培養發現漢堡肉和另 2 位家屬均分離出腸出血性大腸桿菌 O157:H7 菌株，經由脈衝式電泳分析爲同源性腸出血性大腸桿菌 O157:H7 菌株，確定爲一起食物中毒案例。因爲漢堡肉採購自沖繩縣美軍福利社，沖繩縣立衛生環境局便將這起食物中毒案例告知沖繩美國海軍醫院，海軍醫院立即檢測美軍福利社販售的同樣批號未開封的漢堡肉，亦分離出同源性腸

出血性大腸桿菌 O157:H7 菌株，但是日本的微生物資料庫並無此菌株資料，表示並非源自日本或是 1 起新發現的菌種。再將 DNA 指紋圖譜傳送到美國疾病管制局 PulseNet 的資料庫中心比對分析，亦無所獲，美國疾病管制局便將腸出血性大腸桿菌 O157:H7 的 DNA 指紋圖譜放在網站上，請各州公共衛生實驗室注意，同時美國農業部追查此批漢堡肉的製造日期是 2003 年 8 月 11 日，同批號的漢堡肉銷往加州、愛達荷州、奧瑞岡州、華盛頓州和美國位於遠東的美軍基地，美國農業部即刻請製造商下架回收相關製品，總計達 90,000 磅。在已是地球村的世界裡，全球經濟貿易活絡，我們可以採購來自不同國家的產品和商品，但當危害發生時，也會波及到臨國，甚至橫越太平洋或是赤道至地球的另一端，所以國際合作防止危害發生，或是降低危害發生時所負擔的成本是值得每個國家參與。

Hu 博士告訴我，州政府公共衛生實驗室之間或是和聯邦政府的實驗室都有良好的互動，互相技術支援，如有一次的公共衛生事件中，阿拉斯加州政府衛生局就曾派專機送檢驗試劑給華盛頓州政府公共衛生實驗室，使其順利完成任務。聽完 Hu 博士的一番說明後，我的研習行程也進入尾聲，和華盛頓州政府公共衛生實驗室的工作人員一一道別，因為要搭乘凌晨起飛的班機飛回台灣，便趕回旅館整理行李。

參、研習心得與建議事項

首先，感謝華盛頓州立大學食品科學與人類營養學研究所的 Kang Dong-Hyun 博士，和華盛頓州政府衛生廳公共衛生實驗室的 Hu 博士的協助，使得研習計畫順利完成。這趟赴美研習之行的地點是在華盛頓州，雖然當地是寒冷的冬季，但是華盛頓州的人民卻很好客和熱情，路上的行人迎面而來會展露笑容和問好，在研習單位的學者和專家更是既專業又熱心，除了示範實驗和回答所有問題外，還會提供其他資料給我，包括與研習主題相關的論文、年度報告書、或是標準作業程序書等讓我回國後作為參考。以下是這次研習的心得與建議：

- 一、依據美國疾病管制局的統計資料：美國每年約有 7 千 6 百萬人因食物中毒生病，約 32 萬 5 千人需住院治療，而約有 5 千人因食物中毒死亡。因此美國政府積極進行食品源頭衛生安全管理，研發準確又快速的檢驗方法，進行食品衛生安全監視計畫，使受病原菌污染的食品在未上市前或剛上市時，即可偵測出而避免疫情發生，降低社會成本的付出。
- 二、美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫規定，當生鮮蔬果樣品抵達實驗室時，需先檢視外觀是否完好外，還要使用紅外線溫度計偵測溫度並記錄；而華盛頓州生鮮貝類海鮮衛生安全監視計畫亦規定，當生鮮貝類海鮮抵達實驗室時，需先檢視外觀是否完整外，要使用水銀溫度計偵測貝肉溫度並記錄。因為微生物的保存和生長與溫度習習相關，所以美國實驗室相當重視採樣與運送過程時的溫度品質，作為實驗結果的重要參考依據，保證實驗結果的品質。
- 三、美國政府機構採用的食品微生物檢驗方法，仍會由專家和學者所組成的評估小組逐年檢討和修正，並積極嘗試新的食品微生物檢驗方法，只要符合快速、專一性和靈敏度佳等實驗品質要求，即核可成為公告方法，降低實驗所需的時間與人力成本。
- 四、各大型監視計畫的微生物資料庫會互相連結，如美國農業部生鮮蔬果微生物監視計畫的陽性菌株會連結至另外兩個大型計畫：一為國家微生物抗生素感受型監視計畫（National Antimicrobial Resistance Monitoring System）；另一為美國食因性病原菌實驗室分子分型計畫（The PulseNet USA），形成資源共享的網路結構。

五、美國、加拿大與日本等開發國家都有國家核可公告之分子生物技術為主的微生物檢驗方法，我國衛生署公告方法採用分子生物技術者，僅有「食品中動物性成分檢驗方法」和「基因改造食品檢驗方法」，尚無分子生物技術為主的微生物檢驗方法，而中華民國國家標準亦無分子生物技術為主的微生物檢驗方法，分子生物技術作為篩選檢驗方法具有快速和準確性高等優點，對於國內實驗室檢出率較低的病原菌如腸出血型大腸桿菌 O157:H7、李斯特菌等是較佳的篩選檢驗方法，建請主管機關研訂分子生物技術為主的食品微生物檢驗公告方法，增加我國公告方法之廣度與選擇性，符合國際上食品微生物檢驗方法之趨勢。