

出國報告（出國類別：研究）

出席「美國微生物學會第109屆年會」  
及順道參訪微生物實驗室報告

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局

姓名職稱：楊怡真薦任技士

派赴國家：美國

出國期間：中華民國九十八年五月十四日至二十二日

報告日期：中華民國九十八年八月十七日

## 目 次

摘要-----	3
壹、前言-----	4
貳、目的-----	5
參、過程-----	6
一、行程與工作紀要-----	6
二、美國微生物學會年會日期、地點及內容概要-----	6
三、美國微生物學會年會壁報論文展示-----	7
四、美國微生物學會年會研討會及專題演講-----	11
五、參訪美國國家食品安全及技術中心-----	14
肆、心得與建議-----	18
伍、表與圖-----	20
表一、美國微生物學會第 109 屆年會簡要議程-----	20
表二、美國微生物學會依專長領域或興趣分組及各組發表壁報論文篇數-----	21
表三、本局發表之三篇壁報論文-----	23
圖一、本局發表之壁報論文－仙人掌桿菌食品中毒案件分離菌株之腸毒素及嘔吐型 毒素生成基因之分布-----	24
圖二、本局發表之壁報論文－台灣地區金黃色葡萄球菌食品中毒案件分離菌株之抗 藥性-----	25
圖三、本局發表之壁報論文－建立偵測水檢體中病毒之檢驗方法並應用於台灣地區 之食品中毒案件-----	26

## 摘 要

本年度美國微生物學會於美國費城之會議中心舉行，會期由 5 月 17 日起至 21 日止共計 5 天。此次年會包括研習會、座談會、研討會、獲獎人演講、展覽會及論文發表會等。本局今年發表三篇壁報論文，並與各國官方、學界及業界之專家學者交換研究心得，除展現本局之檢驗研究水準，亦對本局未來業務及研究方向多所助益。由年會各活動所蒐集到之資訊可作為本局未來檢驗研究發展之重要參考依據，以提升專業素質及能力。去程時順道參訪美國國家食品安全與技術中心（National Center for Food Safety and Technology），瞭解該中心之研究主題及環境、學習其病毒研究室之病毒檢驗技術，並與其研究人員討論未來研究方向及可能的合作平台，有利於本局未來工作之推展。

## 壹、 前言

美國微生物學會 (American Society for Microbiology, ASM) 於 1899 年創立至今已 110 年，全球會員人數超過四萬三千人，雖名為美國微生物學會，但其中超過三分之一的會員為美國之外的國際會員，故實屬全球性之學術組織。美國微生物學會每年於春夏之交舉辦年會，內容包括數以百計之研習會 (workshops)、座談會 (colloquia)、研討會 (symposia)、獲獎人演講 (award lectures)、展覽會 (exhibits) 及論文發表會 (poster sessions) 等，對於各領域中最先進之微生物學檢驗、研究及利用皆有深入之探討，尤其是論文發表會，每年皆有超過二千篇最新的學術報告發表，並可在發表會場直接與各國專家學者交流，以獲取最新資訊。

美國國家食品安全與技術中心 (National Center for Food Safety and Technology, NCFST) 成立於 1988 年，是由美國食品藥物管理局 (US Food and Drug Administration, US FDA) 的食品安全暨應用營養中心 (Center for Food Safety and Applied Nutrition, CFSAN)、伊利諾理工學院 (Illinois Institute of Technology, IIT) 以及食品工業界所組成的聯合研究中心，旨在藉由產官學界的緊密合作，使食品的管理更具成效。該中心之研究領域包括食品微生物、食品加工及包裝、化學污染物及過敏原，以及保健食品等，尤其在食因性病毒之檢驗及研究方面成果斐然，值得參訪借鏡。

## 貳、 目的

食品安全為世界各國之重要議題，而食品污染病原微生物之問題更是其中不可忽視的一環，以美國 FDA 近年來所發布的食品回收案為例，肇因即多為病原微生物，尤其現今國際貿易往來及交通發達，食品流通迅速，單一污染源即可能造成全球性之影響，各國政府無不謹慎以待。在食品安全衛生之管理上，快速且正確的檢驗方法是找出食品污染源並迅速處理問題食品的重要關鍵。鑑於本局為我國食品衛生安全之最高檢驗機關，為確保本局食因性病原微生物之檢驗與研究具有國際水準、汲取先進國家之研究經驗，並掌握食因性微生物檢驗研究之最新動態及資訊，特前往美國費城參加美國微生物學會舉辦之第 109 屆年會，在會中發表本局研究成果並與全球微生物學家交換研究心得。在食因性病原微生物之檢驗中，檢驗食品中病毒之困難度甚高，原因是許多重要的食因性病毒目前無法在體外培養，且在食品中之污染量極低，必須由大量食品中濃縮病毒，且可導致複雜的食品基質干擾後續檢驗反應等問題。各國尚在不断改進及建立標準化的方法，因此本次行程順道赴 NCFST 之病毒研究室參訪學習，以提升本局檢驗食品中病毒之技術水準。

## 參、 過程

### 一、行程與工作紀要

<u>日 期</u>	<u>工 作 紀 要</u>
5 月 14 日	啓程
5 月 15 日至 16 日	參訪美國國家食品安全與技術中心
5 月 17 日至 21 日	參加美國微生物學會第 109 屆年會
5 月 22 日	回程

### 二、美國微生物學會年會日期、地點及內容概要

本年度美國微生物學會於美國賓州 (Pennsylvania) 費城 (Philadelphia) 的會議中心 (convention center) 舉行第 109 屆年會，會期由 5 月 17 日起至 5 月 21 日止共計 5 天。此次年會包括共約三百場之研習會、座談會、研討會、學術論文發表會、獲獎人演講以及展覽會等，年會議程如表一。

大會於 5 月 17 日下午 5 時舉辦開幕典禮，包括開幕演講及歡迎晚會。開幕演講者包括亞歷桑那大學的 Dr. N.A. Moran、哥倫比亞大學的 Dr. W.I. Lipkin 以及哈佛大學的 Dr. A.H. Knoll。今年適值達爾文 (Darwin) 誕辰二百週年，因此開幕演講的三個題目分別為「微生物共生與演化史」、「在二十一世紀獵殺病原微生物」以及「微生物與地球之歷史」。Dr. Moran 講述微生物與其多細胞宿主之間的共生演化史，其研究發現這種共生已歷經多次演進，並且對許多動植物甚至整個生態系都非常重要，例如共生菌常與其宿主有互補的胺基酸基因，意即共生菌能夠產生宿主無法製造的胺基酸供宿主利用，而某些共生菌也會產生對宿主天敵有毒之毒素，保護宿主免於成為天敵之餐中飧。由於宿主之健康及存活皆須仰賴共生菌，因此共生菌常由母體在子代出生前即傳遞至子代，在昆蟲界尤其常見。微生物共生的研究在近年來蓬勃發展，主要的原因是 DNA 及基因體技術提供研究者絕佳的工具以探討共生之多樣性及揭露微生物對其宿主及族群之貢獻。相對於 Dr. Moran 闡述微生物的光明面，第二位講者 Dr. Lipkin 則在描繪微生物所帶來的黑暗面。他表示，人類與致病微生物的對戰歷時久遠，新的流行性感染症總是不斷地出現，然而我們僅認識其中的極少部分，以目前人類的生活型態看來，未來發生很可能再發生新興的傳染

病。但他相信，我們目前已經發展出非常快速的診斷工具來面對這樣的挑戰。舉例而言，MassTag PCR 就是僅需時六小時的快速檢驗平台，而且價格低廉；GreeneChips 則是可與線上鑑定工具連結的微陣列晶片；若這些新技術都不管用，Dr. Lipkin 就會使用高流量定序 (high throughput sequencing) 技術，與其他方式相比，這是一種革命性的工具，與以往需花費整個機構的資源相比，現在只要一個小型工作團隊在幾天內即可用基因分析方式來認識疾病。這些工具將有助於我們瞭解病原微生物的演化、發現新的、未知的疾病及其來源、探知其疾病生態系中所扮演的角色，以及尋找到可能的疾病治療方法，人類也極可能因為這些工具而能預測及預防下一個 SARS 或愛滋病。第三位講者 Dr. Knoll 由古化石學家的角度研究化石以瞭解古代生命，並以地球化學家的方式由古代沈積岩內的化學物質重塑地球早期的環境樣貌，再融合兩門科學的精髓探索生命如何改變地球，以及地球如何影響生命演化的過程。他講述了微生物在地球歷史發展中的重要貢獻。微生物是最早在出現在地球上的生命，比恐龍、樹木或三葉蟲出現的時序都早得多。事實上，地球大部分的歷史都只有細菌及其他的單細胞生物這些生命存在。早期地球的大氣層充滿二氧化碳和氮氣，還有些氫氣、水蒸氣和甲烷，完全不適合動物生存。當時微生物大量層疊地覆蓋在岩石上以及遍佈在海洋中，尤其是光合細菌的出現，吸收二氧化碳且釋放氧氣，在億萬年的工作之後，地球終於累積足夠的氧氣得以支持大型生命的生存，也因此初始貧瘠如月球表面的地球可以轉化成現今具有富含氧氣的大氣層並充滿多樣且盎然的生命。因此以他的角度看來，人類實在應該感謝生命起源的祖先—現今被視為低等細胞的微生物。

### 三、美國微生物學會年會壁報論文展示

本次大會之壁報論文如同往年分為四個組群 (Divisional groups)，每組群之下依專長領域或興趣再細分為 5 至 8 個組：

- (一) Divisional group I — 診斷微生物學及流行病學 (Diagnostic microbiology and epidemiology)，包括 C、F、L、U 及 Y 組。
- (二) Divisional group II — 致病性及宿主反應機制 (Pathogenesis and host responses mechanisms)，包括 A、B、D、E、G、V 及 Z 組。
- (三) Divisional group III — 普通及應用微生物學 (General and applied microbiology)，包括 I、N、O、P、Q、R 及 W 組。

(四) Divisional group IV — 分子微生物學、生理學與病毒學 (Molecular microbiology, physiology, and virology)，包括 H、J、K、M、S、T、X 及 AA 組。

壁報論文計 2809 篇，群組一至四分別有 469、821、1183 及 336 篇發表。其中環境與普通應用微生物組 (Q 組) 有 482 篇，為各組之冠；微生物生態學組 (N 組)、臨床微生物學組 (C 組) 以及微生物的致病性組 (B 組) 亦分別有 303、285 及 284 篇，以上四組共發表 1354 篇，約佔總發表篇數之 50%。食品微生物學組 (P 組) 則有 131 篇。各組所發表之篇數見表二。本局所發表之壁報論文及參閱展示之壁報論文整理如下。

#### (一) 本局發表之壁報論文

本局今年投稿三篇壁報論文，皆獲大會審查後接受，安排於 5 月 18 日發表，題目包括「(P-015) 仙人掌桿菌食品中毒案件分離菌株之腸毒素及嘔吐型毒素生成基因之分布」、「(P-063) 台灣地區金黃色葡萄球菌食品中毒案件分離菌株之抗藥性」及「(P-071) 建立偵測水檢體中病毒之檢驗方法並應用於台灣地區之食品中毒案件」。三篇論文之英文題目及作者詳見表三，論文內容詳見圖一至圖三。本局所發表之壁報論文吸引包括來自美國 FDA、美國 CDC 及泰國 FDA 等政府機關、加州大學爾灣分校 (University of California, Irvine) 及新墨西哥州立大學 (New Mexico State University) 等大學之研究所、ViraCor Laboratories、CREATV MicroTech 及 Scientific Methods 等廠商之專家學者至發表處詳閱並討論論文內容，不僅對本局之研究方法及成果具有高度興趣，並有專家學者建議未來可研究之方向，其中數點意見與本局研究人員想法不謀而合，以「建立偵測水檢體中病毒之檢驗方法並應用於台灣地區之食品中毒案件」論文為例，建議如下。

1. 本研究乃以模擬檢體建立水檢體中病毒之檢驗方法，再將所建立之檢驗方法嘗試應用於食品中毒案件之水檢體，建議可將檢驗結果與食品中毒案之人體檢體檢驗結果相比較，更具意義。
2. 本研究分別針對大量及少量水檢體建立檢驗方法，可比較同一體積之水檢體以二種方法檢驗之差異。
3. 本研究利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 檢驗食品中毒案件之水檢體，其中以腸病毒之檢

出率最高。然而以 RT-PCR 等分子生物學方法檢出之病毒不一定表示其具有感染力，因此未來可嘗試以病毒培養方式檢驗檢體中具感染力之病毒比例，與分子生物學之結果互相比較。

4. 本研究之檢驗標的包括 GI 型諾羅病毒、GII 型諾羅病毒、腸病毒、星狀病毒、A 型肝炎病毒及 E 型肝炎病毒，建議未來可增加輪狀病毒等其他檢驗標的。
5. 本研究乃針對各種病毒進行檢驗，若亦能進行指標性細菌之檢驗，則可比較病毒與指標性細菌存在於檢體中之相關性。
6. 可考慮以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR) 取代傳統之 RT-PCR，因其具有快速、防止交叉污染以及靈敏度高等優點。

回國後並有其他專家學者以電子郵件要求提供壁報論文檔案，業已全數回覆。

## (二) 參閱展示之壁報論文

茲將與本組業務相關之壁報論文內容摘要如下。

1. 食品中病原微生物之檢驗方法：本年度發表關於食品中病原微生物檢驗之方法大部分仍以分子生物學為原理，包括聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)、即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR)、恆溫環型核酸增幅法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 以及微陣列晶片 (microarray)，亦多有以此些方法為基礎之變化，包括多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR)、逢機增幅核酸多形性－聚合酶連鎖反應 (RAPD-PCR)、巢式即時定量聚合酶連鎖反應 (nested real-time PCR)、多重即時定量聚合酶連鎖反應 (multiplex real-time PCR) 以及將原本應用於蛋白質偵測之鄰位接合技術 (proximity ligation assay) 結合即時定量聚合酶連鎖反應以增加檢測靈敏度。此外，傳統上以病原微生物之 DNA 為分子生物學方法偵測標的之方法可能會產生偽陽性之結果，因為 DNA 在環境中相當穩定，死菌之 DNA 可能造成陽性結果，因此有學者改以病原微生物之 RNA 為偵測標的，以避免偽陽性之問題。論文中亦有以免疫學原理所開發之檢驗方法，例如以免疫磁珠分離 (immunomagnetic separation, IMS) 結合螢光免疫分析法 (fluorescence immunoassay, FIA) 偵測大腸桿菌

0157:H7 (*E. coli* 0157:H7)，或以壓電免疫感測器 (piezoelectric immunosensor) 偵測沙門氏桿菌。

2. 微生物菌株特性：多篇論文探討大腸桿菌 0157:H7、沙門氏桿菌 (*Salmonella* spp.) 及單核球增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、A 型肝炎病毒 (hepatitis A virus) 等重要病原微生物之抗原表現、與背景菌之交互關係、在不同溫度或食品儲存條件下或特定食品中之生長狀況或存活特性、在各種緊迫 (stress) 狀況下之生理或基因調控變化、不同來源菌株之特性比較、追蹤病原菌可能污染食品之途徑等。
3. 風險評估報告：針對重要食源性致病微生物進行風險評估之報告。例如美國 FDA 食品安全暨應用營養中心 (Center for Food Safety and Applied Nutrition, CFSAN) 與加拿大衛生部 (Health Canada) 食品處 (Food Directorate) 兩單位合作，針對乾酪中之單核球增多性李斯特菌進行定量微生物風險評估，以瞭解其對於食品衛生之衝擊。
4. 病原微生物監測計畫：監測食品中重要或新興病原微生物。例如即食肉製品中產志賀毒素之大腸桿菌 (shiga toxin-producing *E. coli*) 及嬰兒食品中 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) 之調查。
5. 病原微生物去除措施：研究特定食品中以不同物理或化學性方式去除病原微生物之方式，以達到維護食品安全之目的。例如探討以 X 光殺滅生鮮牡蠣中創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、以酸化之亞氯酸鈉 (acidified sodium chlorite) 代替氯去除生菜中的沙門氏桿菌、添加乙醯丙酸 (levulinic acid) 或有機酸鹽抑制大腸桿菌 0157:H7 或沙門氏桿菌以及利用噬菌體減少沙門氏桿菌等效果。
6. 細菌抗藥性：調查不同來源之病原菌所具有之抗藥性特性或其抗藥基因特性，或是某些重要抗藥性菌株在食品中之分布。例如檢驗進口食品中對 fluoroquinolone 具有抗性之沙門氏桿菌菌株。
7. 毒力因子：研究毒力因子或毒力因子基因在菌株族群之分布狀況，或毒力因子基因之序列分析。

8. 基因體或質體序列分析：分析特定來源菌株之基因體序列或與其他菌株比較其特性、分析新發現之質體序列，或是利用不同菌種基因體序列之比較結果設計可鑑別檢驗之引子或探針。密西西比州立大學即發表全球第一株 lineage III 單核球增多性李斯特菌菌株的基因體序列。

#### 四、美國微生物學會年會研討會及專題演講

本次年會有多個研討會及專題演講與本組業務密切相關，茲摘要如下。

##### (一) 應用於食品微生物學之新興工具

利用分子生物學為基礎之方法檢驗食品微生物或進行分型以追感染源，是近年來應用於食品微生物之主流技術，尤其是「新世代定序技術（next generation sequencing, NGS）」之突破性發展，使以微生物基因序列為基礎之檢驗或分型技術成為最具潛力的明日之星。過去三十年來，DNA 定序技術一直以 Sanger 法原理進行，亦即以一段單股 DNA 為模板，將 DNA 複製成差距一個鹼基的不同 DNA 片段，再以電泳分離及判讀，即使是新一代的全自動 DNA 毛細管定序儀，仍不脫 Sanger 法原理。NGS 為奈米科技之應用，利用微珠及叢集的技術，一次反應即可讀取數億或數百億個鹼基序列（人體基因體具有 30 億個鹼基序列），過去整個實驗室傾全力以數台定序儀花費數個月所得之資料，以 NGS 只要數小時或數天即可完成，大大節省實驗時間、成本及人力。目前市面上的 NGS 包括 454 FLX Pyrosequencer (Roche)、Solexa 1G Genome Analyzer (Illumina)、SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection) (Applied Biosystems)、HeliScope (Helicos)，以及 VisiGen 及 Pacific Biosciences 公司即將推出的 NGS 儀。雖然之前 NGS 有所讀序列較短及準確率略低的疑慮，但隨著 NGS 儀的改進及推陳出新，已漸漸接近傳統 Sanger 法之水準。

短短數年，NGS 已對生命科學及醫學領域產生革命性的影響，以食品安全領域而言，NGS 提供得到食品檢體或糞便檢體中整個微生物族群之 DNA 序列，因而得知整個微生物族群所包含之微生物是否為預期中的種類或是可能污染到其他原本不應存在於檢體中之種類，因此可以捨棄傳統「指標性微生物」之檢驗，因為指標性微生物（以大腸桿菌最為常用）雖然具有容易培養、存在於所有哺乳動物之糞便中以及

對環境耐受性高等優點，但是大腸桿菌在糞便中所佔比例不高，僅約  $10^6/g$ ，而其他微生物為  $10^{13}/g$ ，且環境中原本即可能存在指標性微生物，其代表性存疑。此外，指標性微生物與病原性微生物的存在之間的相關性亦有待商榷。此方法亦可檢驗食品品質是否腐敗，可應用於食品保存期限之預測。整個微生物族之基因序列同時被研究的概念即所謂宏基因體 (metagenomics)，可作為研究不能培養的未知微生物物種之工具，以病毒檢測而言，環境或糞便檢體中被萃取增幅及定序後再經由資料庫的比對，即可找到已知或未知之病毒。宏基因體又稱為環境基因體學或族群基因體學，藉由研究這些未知的微生物，將帶來新的微生物概念以及於人類健康、農業及環境上的新應用。

此外，利用 NGS 高密度的定序，可以將微生物基因體中所有的單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 完全偵測出來，在追蹤病原菌來源、發現新菌株或研究菌株間多樣性方面亦有莫大的助益，隨著此技術突飛猛進的發展，未來極有可能取代目前視為標準分型方法之脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分型方法。

## (二) 21 世紀的分生檢驗技術發展

近年來，臨床及公衛實驗室面臨愈來愈大的壓力，必須提供更快速、經濟、靈敏性及特異性皆高的檢驗方法，使許多實驗室由傳統培養方法轉而使用分生方法。分生檢驗技術在病原菌的追蹤及基因體之研究上功能強大，例如 PFGE、MLVA (multilocus variable-number tandem repeat analysis)、SNP、基因體定序等分子分型之應用，常使流行病學調查的結果由原來未分型前的不相關變為相關，並且在檢驗生長緩慢難以培養的病原微生物方面更是助益良多，例如結核菌及諾羅病毒的檢驗，然而分生技術也有其缺點，例如成本可能較高、無法區分死菌及活菌、且靈敏性有時候高到無法解釋。此外，傳統培養方法已有 150 年的歷史，分生技術則只有約 20 年，所以分生方法可能無法完全取代傳統培養方法，但確實可減少實驗室對傳統方法之依賴。

## (三) 聖保羅沙門氏桿菌 (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Saintpaul, *Salmonella* Saintpaul) 事件之省思

2008 年發生的聖保羅沙門氏桿菌食品中毒案件是美國歷史上最大規模的案件之一，患者數高達 1300 人以上，遍及 43 州、華盛頓特區及加拿大，事件持續時間長久，由 4 月開始出現病例直至 8 月方才停歇（集中於 5、6 月），相關產業之損失更難以估算，且嫌疑食品中由事件初期公布之蕃茄轉變為 jalapeno 及 serrano 辣椒，更使得 FDA、CDC、州及地方衛生局等食品安全機關深自檢討、記取教訓。因此本年度之年會至少有三場研討會與此事件直接相關，可見微生物界對此議題之重視。此案件之調查於 2008 年 5 月 22 日新墨西哥州衛生局通報 CDC 有 4 名患者感染 *Salmonella* Saintpaul 開始，CDC 與州及地方衛生局經由流行病學分析後發現食用生鮮蕃茄與此案件具有統計學上之相關性，因此於 5 月 31 日行文 FDA 此調查結果，FDA 立即開始進行受污染食品來源之追蹤及檢驗，並於約 1 週後發布訊息警告消費者勿食用生鮮蕃茄。然而因生鮮蔬果儲存時間短，在消費者發病後不易採集到剩餘檢體，且生鮮蔬果通常缺乏完整包裝，經銷商或零售店亦可能將不同產地來源之產品混合販賣，使調查之困難度倍增。雖然如此，FDA 仍依程序每日更新最新調查結果，例如排除某些產地之蕃茄為嫌疑食品，恢復民眾購買安全蕃茄之信心，並減少對相關產業之衝擊。在 FDA 發布蕃茄警訊之後，中毒病例數亦開始下降。此時 FDA、CDC、州及地方衛生局仍持續調查工作，至 6 月 30 日，CDC 通知 FDA 最新的流行病學調查結果，即 jalapeno 及 serrano 辣椒可能也為嫌疑食品，於是 FDA 擴大其調查範圍，並呼籲老人、小孩及免疫力差的民眾勿食用生鮮 jalapeno 及 serrano 辣椒，然而此時中毒病例數較疫情高峰期已大幅下降。7 月 21 日，FDA 在德州一家蔬果配送中心採集的 jalapeno 辣椒檢驗出與患者相同基因型的沙門氏桿菌菌株，其後終於在 7 月 25 日確定受污染之辣椒來自墨西哥。FDA、CDC 及其他相關單位事後深自檢討事件始末，歸納出下列可改進之項目：

1. 生鮮蔬果追溯系統之改良 — FDA 與業者、消費者團體、其他國內政府單位及國外政府加強溝通，以瞭解何為最佳之追溯系統，例如電子化技術之應用，並以蒐集之資訊做成對業者之建議，以改良追溯系統。目前已協助佛羅里達州建立蕃茄業者之最佳工作指南，其內即包括追溯系統之建議。
2. 食品中毒案件調查能力之加強 — 在美國，食品中毒案件發生時通常是地方衛生局調查，規模較大或跨州之案件再由 CDC 協助支援，而流行病學之調查

結果為找出污染源之重要依據，左右可疑食品檢體調查之方向。本次案件發生初期之流行病學調查結果指出蕃茄為嫌疑食品，然而 FDA 之檢驗一直未來在蕃茄找到相同基因型之沙門氏桿菌，所幸其後數家餐廳發生較大規模之同型沙門氏桿菌中毒案，才由新的流行病學資料指向嫌疑食品為辣椒，然而已造成蕃茄業者龐大的損失，成堆安全的蕃茄因而被平白丟棄，可見流行病學調查之影響力。因此若能加強調查能力，則可盡早找出污染源、減少損失及資源的浪費。而此次調查亦發現原來受污染的辣椒成為污染源交叉污染其他食品而產生同樣型別沙門氏桿菌感染之病例，使調查複雜度提高，當蕃茄警訊發布之後中毒病例數急劇下降，雖然專家據此認為蕃茄也是造成此次案件原因之一，然而也可能是辣椒通常不單獨食用，而常與蕃茄做成莎莎醬（salsa sauce）等食品，避免食用蕃茄也降低食用受污染辣椒之風險所造成之現象。以上這些經驗皆可作為未來進行流行病學調查之參考。

3. 食品安全事件應變能力的提升 — 本案件由 4 月持續至 8 月，歷時久、損失大，應縮短反應時間，包括加強快速檢驗食品中微生物之能力。
4. FDA 權力之擴張 — FDA 提出食品保護計畫（Food Protection Plan）以賦予 FDA 更多法律權力，例如 FDA 可對特定高風險食品發布額外的預防保護措施、若業者自願回收問題食品之效率不良，FDA 可強制回收，以及給予 FDA 在緊急狀況下更容易取得食品紀錄之權力等。
5. 增加 FDA 之經費 — FDA 於 2009 年會計年度之經費大幅增加，其中大部分（1.25 億美金）將用於食品保護計畫所需之費用，使 FDA 有更多資源以執行保障食品安全之任務。

## 五、參訪美國國家食品安全及技術中心

FDA 成立 NCFST 之目的在創造一個與業界直接聯繫的平台，NCFST 位於伊利諾州芝加哥地區，建築物即為 Corn Products 食品廠商所捐贈，顯見 NCFST 與業界之關係匪淺。NCFST 之經費來源除了 FDA 及 IIT 之外，也包括食品廠商所貢獻之經費，依食品廠商之年營收金額決定其會員等級及會費金額，食品廠商並可提出其有興趣之研究領

域及項目與 FDA 及 IIT 之研究人員合作。目前許多美國國內的食品大廠都是 NCFST 的會員。

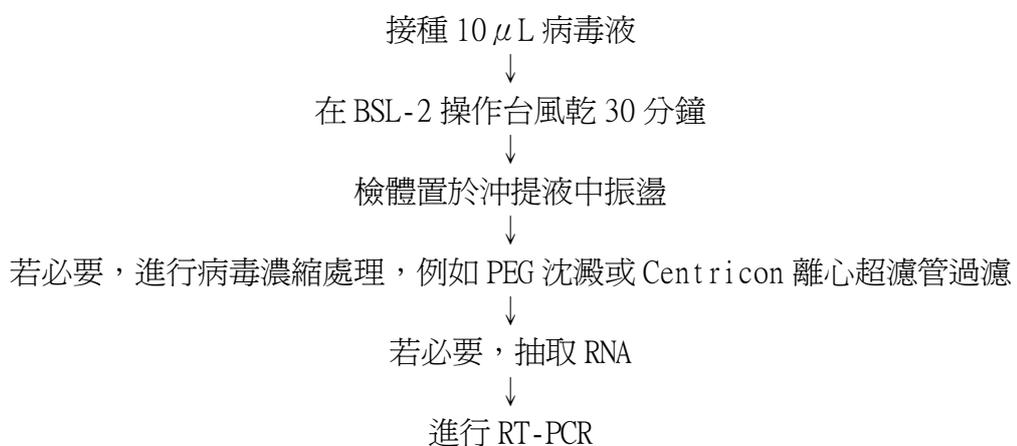
NCFST 目前人員數約有 75 位，其中 28 位為 FDA 人員，47 位為 IIT 人員。本次行程除了參訪我國旅美病毒專家謝毓賢博士之研究室之外，並拜會食品加工及科技組組長 Dr. Richard E. McDonald、食品科技部主任 Dr. Mary Lou Tortorello 及 IIT 教授 Dr. Alvin Lee 等專家學者，其中 Dr. Mary Lou Tortorello 為微生物學家，亦兼任 ASM 食品微生物學組之主席，對於本局目前面臨之挑戰及未來可能與 NCFST 之合作深感興趣。由於 NCFST 之組成包含 IIT，因此可提供食品安全、食品技術以及食品加工之碩士學位及專業學位 (professional degree) 之教育學程，目前約有 50 位碩士學生，除此之外，還有短期課程學分、研討會及討論會。FDA 之研究人員亦可擔任研究生之指導教授。雖然目前僅有碩士學位學程，但謝毓賢博士表示，非常歡迎我國研究人員至該中心進行博士後研究或短期研究。此外，NCFST 亦於每週五下午邀請中心之研究人員、學者、業界專家及國內外之政府官員擔任研討會系列 (seminar series) 之講座，提供合適環境予 NCFST 教職員、學生及有興趣參與之相關人士，共同討論食品安全及加工技術的最新研究及議題。

目前 NCFST 的主要研究領域包括：

1. 食品微生物：食源性病原微生物之檢驗方法建立及其生長、存活、逆境反應 (stress response) 及失活特性等研究。
2. 食品加工及包裝：研究加工及包裝步驟在食品安全、品質及營養上可能帶來的影響。
3. 化學污染物及過敏原：探討加工技術對食品中之污染物及過敏原有何影響，以進一步預防、降低或去除之。
4. 保健食品：以科學評估為基礎，利用食品改進大眾健康及降低罹病風險。

NCFST 的微生物研究平台還包括對抗生物恐怖之食品防禦及操作風險管理計畫 (food defense and operational risk management program)，研究非傳統食品病原微生物在食品中之狀態、食品包裝對這些微生物之影響及合適的去除方法。雖然全美有許多實驗室皆具有檢驗能力，但 NCFST 在食品防禦上分析上具有優勢，例如其 BSL3 級微生物實驗室及微生物污染先導工廠等設備即有助於 NCFST 於此領域之研究。

NCFST 在食品微生物之研究計畫目前正進行病毒檢驗方法之建立及相關研究，由謝毓賢博士領導研究團隊。謝博士在病毒檢驗方面之研究領域已鑽研超過二十年，發表多篇相關論文於國際知名期刊，並於 2008 年在 FDA 與紐約市立大學約克學院合辦之年度實驗室研討會「食品中微生物污染之快速檢驗」講授 A 型肝炎病毒之檢驗方法。謝博士之研究團隊近年來正建立蔬果中病毒之檢驗方法，恰與本組本年度病毒領域之科技發展計畫題目相同。其所開發之方法相當簡單快速，如下列添加試驗之流程所示。



依據 NCFST 病毒研究室過去之經驗，青蔥檢體使用 3%牛肉抽出物 (beef extract) (pH 8) 作為沖提液效果最佳，菠菜檢體則以 PBS+2%血清 (pH 7.5) 之回收率最好。其中振盪檢體之步驟建議以震波器 (pulsifier) 處理，因為震波器以高頻擊打檢體袋外表產生震波，不將食品檢體打碎但可將附著在食品表面之微生物震落到沖提液中，而傳統的鐵胃 (stomacher) 打碎食品檢體後，食品中的許多 PCR 抑制物質很可能會被釋放到沖提液中，干擾後續的檢驗過程。此外，由於此流程所得之沖提液所含之雜質相當少，因此 RNA 的抽取並非必要過程，或可直接取沖提液進行 RT-PCR。除了檢驗方法建立之外，病毒在食品或環境中之存活能力亦為研究主題之一。以 A 型肝炎為例，曾進行其於菠菜葉上之存活試驗，結果發現在冷藏條件下其 D 值為 28.6 天。而由於人類諾羅病毒 (human norovirus) 目前仍無法進行體外培養，因此以 Ram 264.7 細胞株培養鼠類諾羅病毒 (murine norovirus) 作為研究人類諾羅病毒存活特性之材料。本年度正進行病毒於環境表面之存活試驗，將病毒接種於環境表面固定時

間後，以細胞培養及 RT-PCR 方法進行病毒檢驗，前者可偵測到仍具感染力之病毒，而不論是否具有感染力之病毒皆可被後者偵測到，若比較兩者之檢驗結果，則可推測目前一般實驗室以 RT-PCR 作為檢驗方法偵測到不具感染性病毒之比例，對食品安全管控之影響甚為重大。

由於食品中病毒檢驗方法可能因不同之食品種類而有不同的前處理步驟，因此必須依照不同食品之特性分別開發不同的檢驗方法。目前本局已參考歐美等國之文獻，針對牡蠣、蔬果及水等高風險檢體建立檢驗方法，然而我國國人之飲食習慣有異於外國民眾，因此我國最常引起病毒性食品中毒案件之嫌疑食品可能與歐美等國不盡相同，所以除了針對各國常見之高風險檢體建立檢驗方法外，謝博士建議本局可依據流行病學方法調查我國食因性病毒所引起之食品中毒案之嫌疑食品種類，以作為未來開發本土性食品檢驗方法之方向，此建議相當可行。此外，進行食因性病毒之官方檢驗方法及確效試驗一直是各病毒實驗室努力的目標，然而其困難度比細菌檢驗方法高出甚多，謝博士歡迎本局與其研究室合作開發方法，例如可進行共同試驗（collaborative study），此舉不僅可節省雙方實驗室之資源，更利本局之檢驗技術與國際接軌。

#### 肆、心得與建議

- 一、 本局今年投稿三篇壁報論文，皆獲大會審查後接受，所發表之論文吸引各國官方、學界及業界之專家學者至發表處詳閱內容、交換研究心得及提供建議，除展現本局之檢驗研究水準，亦對本局未來業務及研究方向多所助益。今年所發表的三篇論文皆為本年度食品微生物領域之熱門研究主題，研究方法亦廣為各界研究者使用，顯示本局已可掌握現今微生物學研究之脈動，且檢驗水準並未落人後。而由參閱其他壁報論文及參加專題演講所蒐集到之資訊 — 例如快速檢驗方法、NGS 技術及分生檢驗發展之趨勢等 — 可作為本局未來檢驗研究發展之重要參考依據，以提升專業素質及能力。
- 二、 美國近年來屢次發生大規模之食品中毒案，其範圍甚至可波及全球，無疑為食品安全之最佳教材，可作為國內食品安全管理之借鏡。而美國於 2008 年發生之 *Salmonella* Saintpaul 事件亦使 FDA、CDC、州及地方衛生局等食品安全管理機關記取教訓、深自檢討，歸納出改良生鮮蔬果追溯系統、加強食品中毒案件調查能力、提升食品安全事件應變能力、擴張 FDA 權力及增加 FDA 經費等可改進之項目，可供國內各食品安全相關機關參考，以加強我國因應國際性大規模食品中毒案件之處理能力。
- 三、 本局今年正進行蔬果中病毒之檢驗方法開發，可參考赴 NCFST 參訪其病毒研究室所獲得之檢驗研究資訊。我國目前已依國際文獻建立牡蠣及水等高風險檢體之檢驗方法，然而各國人民之飲食習慣有異，未來可依據流行病學方法調查我國食因性病毒所引起之食品中毒案之嫌疑食品種類，作為未來開發本土性食品檢驗方法之方向，以迅速釐清食品中毒案之污染源，並利食品安全之管理。
- 四、 加強專業領域之國際合作。本局未來可與 NCFST 合作共同開發檢驗方法，或是效仿美國及加拿大與貿易往來頻繁且飲食文化相似之鄰近國家合作進行食品風險評估，不僅可節省雙方資源、促進效率，更有利檢驗方法或管理規範等與國際接軌。
- 五、 美國 FDA 與 IIT 共同成立 NCFST，因此 NCFST 可提供碩士學位及專業學位等教育學程，FDA 之研究人員亦可擔任研究生之指導教授。未來我國成立之食品藥物管理局或可參考此模式，與學術機關合作，廣納研究生或研究人員，以提升研究能量。
- 六、 食品病原微生物是國際間食品安全問題的重要議題，不僅威脅民眾健康、增加國家

醫療體系之負擔，亦造成經濟損失。我國應持續投注相當之資源於食品病原微生物之檢驗及研究，例如持續利用參與國外會議與訪問行程加強國際人才之訓練與資訊之交流等，使人員的研究或行政管理能力具國際水準及符合國際潮流。

表與圖

表一、美國微生物學會第 109 屆年會簡要議程

日期	時間	活動
5 月 16 日	8:30 am—4:30 pm	研習會
5 月 17 日	8:30 am—4:30 pm	研習會
	5:00 pm—7:30 pm	開幕典禮
	7:30 pm—9:00 pm	開幕歡迎會
5 月 18—20 日	8:15 am—10:40 am 2:30 pm—5:00 pm	座談會及研討會
	10:45 am—12:15 pm 1:00 pm—2:30 pm	壁報論文展示
	9:00 am—4:00 pm	展覽會
	11:00 am—12:00 noon 1:00 pm—2:00 pm	獲獎人演講及口頭論文報告
5 月 21 日	8:00 am—10:30 am	座談會及研討會
	10:30 am—12:00 noon	壁報論文展示

表二、美國微生物學會依專長領域或興趣分組及各組發表壁報論文篇數

Divisional Group	Division	Division Name	No. of Posters
Divisional Group I	Division C	Clinical Microbiology	285
	Division F	Medical Mycology	73
	Division L	Healthcare Epidemiology	10
	Division U	Mycobacteriology	59
	Division Y	Public Health	42
Divisional Group II	Division A	Antimicrobial Chemotherapy	123
	Division B	Microbial Pathogenesis	284
	Division D	Bacteria of Medical Importance	213
	Division E	Immunology	105
	Division G	Mycoplasmology	16
	Division V	Clinical and Diagnostic Immunology	16
	Division Z	Animal Health Microbiology	64
Divisional Group III	Division I	General Microbiology	96
	Division N	Microbial Ecology	303
	Division O	Fermentation and Biotechnology	61
	Division P	Food Microbiology	131
	Division Q	Environmental and General Applied Microbiology	482
	Division R	Evolutionary and Genomic Microbiology	90
	Division W	Microbiology Education	20
Divisional Group IV	Division H	Genetics and Molecular Biology	97
	Division J	Cell and structural Biology	30
	Division K	Microbial Physiology and Metabolism	95
	Division M	Bacteriophage	45

	Division S	DNA viruses	12
	Division T	RNA viruses	23
	Division X	Molecular, Cellular, and General Biology of Eukaryotes	17
	Division AA	Free-Living, Symbiotic, and Parasitic Protists	17

表三、本局發表之三篇壁報論文

編號	展示時間	題目	作者
P-015	5/18 10:45 am	仙人掌桿菌食品中毒案件分離菌株之腸毒素及嘔吐型毒素生成基因之分布 (The Distribution of Enterotoxin and Cereulide Synthetase Genes in <i>Bacillus cereus</i> from Food Poisoning Suspect Samples)	張育彰、高淑娟、楊怡真、王貞懿、施養志
P-063	5/18 1:00 pm	台灣地區金黃色葡萄球菌食品中毒案件分離菌株之抗藥性 (Antimicrobial Resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> Isolates Obtained from Food Poisoning Outbreaks in Taiwan)	黃翠萍、王叔苑、張育彰、楊怡真、王貞懿、施養志
P-071	5/18 1:00 pm	建立偵測水檢體中病毒之檢驗方法並應用於台灣地區之食品中毒案件 (Method for Detecting Viruses in Water and the Application to Foodborne Outbreaks in Taiwan)	楊怡真、余俊逸、張育彰、王叔苑、王貞懿、施養志



# The distribution of enterotoxin and cereulide synthetase genes in *Bacillus cereus* from food poisoning suspect samples

Add: 161-2, Kunyang St.,  
Nangang, Taipei, Taiwan  
Tel: 886-2-26531270  
E-mail: yuchang@nhtd.gov.tw

Y-C. Chang<sup>1</sup>, S-C. Kao<sup>2</sup>, I-C. Yang<sup>1</sup>, J-Y. Wang<sup>1</sup>, Y-C. Shih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Microbiology Division, Bureau of Food and Drug Analysis, Department of Health, Executive Yuan, Taiwan; <sup>2</sup>Department of Nutrition and Health Science, Toko University, Taiwan

*Bacillus cereus* strains were examined for the presence of 5 enterotoxin and emetic toxin genes by PCR and hemolysin enterotoxin by reverse passive latex agglutination. A total of 66 isolates recovered from food poisoning outbreak suspect samples in years 2006–2008. Varying distribution pattern of these genes was observed among the isolates. While, nonhemolytic enterotoxin (*nhe*) and enterotoxin FM (*entFM*) genes were found in all the 66 strains, and 62.1%, 65.21% and 62.1% were positive for cytotoxin K (*cytK*), enterotoxin T (*bceT*) and hemolysin BL (*hbl*) genes, respectively. Thirty-two percent of all tested strains were harboring all the 5 enterotoxin genes, but only 12.1% were positive for cereulide synthetase gene, which was recognized as the emetic toxin related gene. The analysis of the results obtained by CRET-RPLA method for the productivities of hemolysin enterotoxin and the results obtained by PCR for the presence of *hbl* revealed the correlation between each other.

**Introduction**

*Bacillus cereus* food poisoning is a major concern worldwide. Food-borne diseases caused by *B. cereus* are traditionally classified as diarrheal and emetic syndromes. The former is caused by enterotoxins produced during growth of the microorganism in the small intestine, the latter is caused by cereulide produced by the microorganism in food prior to consumption. However, the poisoning is only caused by toxigenic strains of *B. cereus*. Diarrheal poisoning is caused by heat-labile enterotoxins produced during vegetative growth of *B. cereus* in the small intestine. Five different enterotoxins have been characterized: two protein complexes, hemolysin BL (HBL) and nonhemolytic enterotoxin (NHE), and three enterotoxin proteins, enterotoxin T (bo-D-ENT), cytotoxin K (CytK), and enterotoxin FM (EntFM). Emetic disease is caused by cereulide. The objective of the present work was to detection of the cereulide synthetase (*cemA*, *cemC*) and enterotoxin (*hblA*, *hblC*, *hblE*, *entFM*, *bceT*, *cytK*) genes, analyze the distribution of toxin genes and to compare enterotoxin profiles to those food poisoning strains.

**Methods**

**Bacterial isolates**

All available *B. cereus* isolates (*n* = 66) related to 15 food-borne outbreaks of disease from 2006 to 2008 were studied. The 66 isolates of *B. cereus* used in this study were sourced from foodborne outbreak-suspect samples and environmental swab samples which were obtained by swabbing the surfaces of kitchen equipment and cooler hands in food poisoning outbreaks (Table 1).

**DNA extraction and Amplification of toxin gene**

The strains were grown in trypticase soy broth at 35°C for 24 hours. After harvest, the DNA was extracted with Puregene DNA Isolation Kit (Model D5000A, Gentra System, Inc., Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. To determine whether the *B. cereus* isolates carry

toxin genes, we used polymerase chain reaction (PCR) amplification to detect cereulide synthetase (*cemA*, *cemC*) and enterotoxin (*hblA*, *hblC*, *hblE*, *entFM*, *bceT*, *cytK*) genes. The primers used for the amplification of these genes and the predicted sizes of the amplification products are listed in Table 2. The PCR assay was performed with a PCR thermal cycler (PCR cycle: 9700, Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Ten microliters of the reaction mixture was then analyzed by gel electrophoresis in 2.0 % agarose at 90 V, and the reaction products were visualized with UV light after staining with ethidium bromide.

Table 2. The oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5' – 3')	Intoxin size (bp)	Reference
HA-F1	ATT AAT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T	227	Yang et al., 2006
HA-R1	TGA TCC TAA TAC TTC TTA TAG ACG CTT		
HC-F1	AAT ACT CTC GCA ACA GCA AT	228	Yang et al., 2006
HC-R1	TGA TTC GTC ATA GGC ATT TCT		
HA-F1	ATT ACA GGG TTA TTA ATT ACA GCA AT	478	Yang et al., 2006
HA-R1	AAT CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T		
HE-F1	TG CAG CAG CTG TAG GGG GT	228	Yang et al., 2006
HE-R1	TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT		
FM-F2	CAA AAA CTT GAT AAC AAA AAG TGG T	290	Yang et al., 2006
FM-R2	TGT TTA CTC GGC CTT TTA CAA ACT T		
Bo-F1	AGG TGG GAG GAG GAG CAA CAA TGT	751	Yang et al., 2006
Bo-R1	GTA TTT CTT TCC GGC TGG CTT TTT		
Cy-F1	ATC GGG CAA AAT GCA AAA ACA CAT	505	Yang et al., 2006
Cy-R1	ACC CAG TTA T) (G)CA GTT CCG AAT GT		
BB-F1	GAC AAG ABA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA	658	Yang et al., 2006
BB-R1	GCA GGC TTC CAA TTA CTC CTT CTG CCA CAA T		
BL-F1	ATT GCT TTA AAC TAG ATG CC	891	This study
BL-R1	CTT GCG ATT ACT GCT TCT GGC		

\* have been modified

**Enterotoxin immunoassays**

The HBL enterotoxins were detected with commercial kits (SCET-RPLA, Denka Seiken, Tokyo, Japan). The assay was performed according to the manufacturer's instructions.

**Results and discussion**

The distribution of enterotoxin genes in food-borne *B. cereus* is given in Table 3. Forty-one (62.1%), 42 (63.6%), 41 (62.1%) strains were positive for hemolysin BL (*hbl*), enterotoxin T (*bceT*) and cytotoxin K (*cytK*) genes, respectively. More

Table 4. Toxinogenic patterns of food-borne *B. cereus* strains

Group (no. of samples)	Toxinogenic patterns						
	entFM	hblA/C	hblE	bceT	cytK	entFM	entFM
A 5 (3)	+	+	+	-	-	-	-
B 6 (2)	+	+	+	-	-	-	-
C 3 (1)	+	+	+	-	-	-	-
D 4 (2)	+	+	+	-	-	-	-
E 4 (2)	+	+	+	+	+	-	-
F 7 (3)	+	+	+	+	+	-	-
G 12 (8)	+	+	+	+	+	-	-
H 7 (5)	+	+	+	-	-	-	-
I 3 (1)	+	+	+	+	+	-	-
J 2 (1)	+	+	+	+	+	-	-

Table 3. Results from PCR and SCET-RPLA immunological analysis of *Bacillus* isolates

Outbreak no.	Sample (no. of strains)	Reference strain ID	Presence (+) or absence (-) of toxin gene						
			entFM	hblA/C	hblE	bceT	cytK	entFM	entFM
1	swabbing of cutting board (3)	A191	+	+	+	+	+	+	-
2	swabbing of wash cloth (2)	A192	+	+	+	+	+	+	-
3	swabbing of wash cloth (2)	A193	-	-	-	-	-	-	-
4	swabbing of egg (2)	B190	+	+	+	+	+	+	-
5	corn neck (2)	B117	+	+	+	+	+	+	-
6	chicken leg in honey (2)	B119	+	+	+	+	+	+	-
7	rice (2)	B120	-	-	-	-	-	-	-
8	swabbing of cutting board (2)	B121	+	+	+	+	+	+	-
9	rice (1)	B122	-	-	-	-	-	-	-
10	swabbing of cutting board (2)	B123	+	+	+	+	+	+	-
11	swab (2)	B124	-	-	-	-	-	-	-
12	swab (2)	B125	-	-	-	-	-	-	-
13	swab (2)	B126	-	-	-	-	-	-	-
14	swab (2)	B127	-	-	-	-	-	-	-
15	swab (2)	B128	-	-	-	-	-	-	-
16	swabbing of cutting board (2)	B129	+	+	+	+	+	+	-
17	swab (2)	B130	-	-	-	-	-	-	-
18	swab (2)	B131	+	+	+	+	+	+	-
19	swab (2)	B132	+	+	+	+	+	+	-
20	swab (2)	B133	+	+	+	+	+	+	-
21	swab (2)	B134	+	+	+	+	+	+	-
22	swab (2)	B135	+	+	+	+	+	+	-
23	swab (2)	B136	+	+	+	+	+	+	-
24	swab (2)	B137	+	+	+	+	+	+	-
25	swab (2)	B138	+	+	+	+	+	+	-
26	swab (2)	B139	+	+	+	+	+	+	-
27	swab (2)	B140	+	+	+	+	+	+	-
28	swab (2)	B141	+	+	+	+	+	+	-
29	swab (2)	B142	+	+	+	+	+	+	-
30	swab (2)	B143	+	+	+	+	+	+	-
31	swab (2)	B144	+	+	+	+	+	+	-
32	swab (2)	B145	+	+	+	+	+	+	-
33	swab (2)	B146	+	+	+	+	+	+	-
34	swab (2)	B147	+	+	+	+	+	+	-
35	swab (2)	B148	+	+	+	+	+	+	-
36	swab (2)	B149	+	+	+	+	+	+	-
37	swab (2)	B150	+	+	+	+	+	+	-
38	swab (2)	B151	+	+	+	+	+	+	-
39	swab (2)	B152	+	+	+	+	+	+	-
40	swab (2)	B153	+	+	+	+	+	+	-
41	swab (2)	B154	+	+	+	+	+	+	-
42	swab (2)	B155	+	+	+	+	+	+	-
43	swab (2)	B156	+	+	+	+	+	+	-
44	swab (2)	B157	+	+	+	+	+	+	-
45	swab (2)	B158	+	+	+	+	+	+	-
46	swab (2)	B159	+	+	+	+	+	+	-
47	swab (2)	B160	+	+	+	+	+	+	-
48	swab (2)	B161	+	+	+	+	+	+	-
49	swab (2)	B162	+	+	+	+	+	+	-
50	swab (2)	B163	+	+	+	+	+	+	-
51	swab (2)	B164	+	+	+	+	+	+	-
52	swab (2)	B165	+	+	+	+	+	+	-
53	swab (2)	B166	+	+	+	+	+	+	-
54	swab (2)	B167	+	+	+	+	+	+	-
55	swab (2)	B168	+	+	+	+	+	+	-
56	swab (2)	B169	+	+	+	+	+	+	-
57	swab (2)	B170	+	+	+	+	+	+	-
58	swab (2)	B171	+	+	+	+	+	+	-
59	swab (2)	B172	+	+	+	+	+	+	-
60	swab (2)	B173	+	+	+	+	+	+	-
61	swab (2)	B174	+	+	+	+	+	+	-
62	swab (2)	B175	+	+	+	+	+	+	-
63	swab (2)	B176	+	+	+	+	+	+	-
64	swab (2)	B177	+	+	+	+	+	+	-
65	swab (2)	B178	+	+	+	+	+	+	-
66	swab (2)	B179	+	+	+	+	+	+	-

than 26.4% of isolates had harbored five toxin genes. All of the *B. cereus* isolates harbored *hblA*, *hblE*, and *entFM* and all of the SCET-RPLA positive strains also gave *hbl*-positive results in the PCR assay. These results are in agreement with those of Yang et al., who found that *B. cereus* isolated from food poisoning carried genes *hbl* and *entFM*.

According to the presence of toxin genes, all 66 *B. cereus* strains collected in this study belonged to 10 different toxinogenic patterns from pattern A to J (Table 4). The distribution of toxin genes in this study corroborated with findings by other studies. Our analysis demonstrated that all of the food-borne isolates described here are potential causes of food poisoning, since all possess at least one enterotoxin gene. However, the enterotoxic potential of *B. cereus* isolates may vary from strain to strain and further studies are required to determine the different levels of pathogenicity among the various strains.

**References**

Castro R, Regalado B, Carrón L, Abegondo L, Palomares T, Gonzalez V. 2008. Multiple-toxin sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. *Appl Environ Microbiol* 74(3): 836-841.  
Yang IC, Shih CY, Huang TP, Wang JY, Hsu TM. 2005. Assessment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxinogenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J Food Prot* 28(12): 2120-2126.

圖一、本局發表之壁報論文 — 仙人掌桿菌食品中毒案件分離菌株之腸毒素及嘔吐型毒素生成基因之分布

P-063



# Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates obtained from food poisoning outbreaks in Taiwan

Add: 161-2, Kuen Yang St., Nankang, Taipei, 11513, Taiwan, R.O.C.  
Tel: 886-2-26531272  
E-mail: nfan0764@nhri.gov.tw

T.P. Huang, S.W. Wang, Y.C. Chang, L.J. Yang, J.Y. Wang, D.Y.C. Shih  
Bureau of Food and Drug Analysis, Department of Health, Executive Yuan, R.O.C.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* ranked top two of etiology of food poisoning outbreaks in Taiwan during the last twenty years. In addition, according to the data source from Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) NHRI project, the 5 most frequently reported pathogens from clinic sources were *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. Antibiotic susceptibilities for *Staphylococcus aureus* strains collected from food poisoning outbreaks in Taiwan were analyzed in 2002 (N=100), 2005 (N=196) and 2007 (N=93). Our data demonstrated that 96% (334/389) tested strains were multidrug resistant strains and the multiple antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* was increasing. In 2007, one strain showed resistance to 11 antibiotics in VITEK 2C AST GP-545 kit, the antibiogram was PoxCimpCmCipCmVaTetSt.

## INTRODUCTION

Antimicrobial resistance has become a major health problem worldwide. Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) is the first nationwide surveillance system for antibiotic resistance in Taiwan, which was implemented in 1999 and is conducted every two years to monitor resistance trends and detect emerging resistance. TSAR collects clinical bacterial pathogens isolated from inpatients and outpatients of medical centers and regional hospitals located throughout Taiwan for national quantitative antimicrobial susceptibility testing. Data from TSAR have been used to promote national action in controlling antimicrobial resistance. In general, the aim of antibiogram is to assist the therapeutic decision. It is also used for epidemiological monitoring of bacterial resistance, to aid empirical therapy, comparing to other isolates and bacterial identification. According to TSAR, *Staphylococcus aureus* is one of the 5 most frequently reported pathogens from clinic sources. *Staphylococcus aureus* is recognized as an important foodborne pathogen globally, and ranked top two of etiology of food poisoning outbreaks in Taiwan. In this study, we intended to establish a database different from clinic sources by using the isolates of food poisoning outbreaks.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolation of *Staphylococcus aureus* :** Sample collected from the food poisoning outbreak was suspended in peptone water, and dilutions was spread on the surface of Baird-Parker agar. The plates were incubated for 48 h at 37°C and typical colonies (black to dark grey, smooth, convex, well-defined centers, surrounded by a dull halo) were counted and the number expressed in CFU/g or ml. Representative of each colony type were checked by Gram method for purity and morphology, and submitted to catalase and coagulase tests. Confirmation was performed by a biochemical identification system.

**Antibiotics susceptibility test :** A total of 100 *Staphylococcus aureus* isolates were analyzed in 2002. Susceptibilities to 38 antimicrobial agents were assessed by a disk diffusion method that used the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). There were 196 and 93 isolates analyzed in 2005 and 2007 by the Vitek GPS-112 and Vitek 2C AST-P545 kit, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

Most isolates collected before 2002 were susceptible to 38 antibiotics by disk diffusion method. The resistant rates among them were penicillin 98%, erythromycin 98%, tetracycline 39%, chloramphenicol 28%, kanamycin 12%, erythromycin 8%, clarithromycin 8%, fusidic acid 5%, and rifampicin/trimethoprim 2%. Isolates collected between 2002-2005 were analyzed by Vitek GPS-112, and the result of antibiotic susceptibility test showed as following: ampicillin 92%, penicillin 92%, tetracycline 43%, erythromycin 14%, amoxicillin/clavulanic acid 3%, oxacillin 3%, ofloxacin 3%, and trimethoprim/sulfamethoxazole 3%. Isolates collected from food poisoning outbreaks in 2007 were analyzed by Vitek 2C AST-P545 kit, data as below: benzylpenicillin 61%, tetracycline 70%, oxacillin 17%, rifampin 17%, gentamicin 12%, erythromycin 8.6%, clindamycin 8.6%, ciprofloxacin 7.5%, and trimethoprim/sulfamethoxazole 4.3%. According to these data, these antibiotic with resistant strains percentages were increasing, and MRSA was found, though not so high as the clinic sources. MRSA was first documented in Taiwan in the early 1980s. Since then, Data, Surveillance from Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan, showed there has been a remarkable increase in prevalence of MRSA in nosocomial infections (from 26.7% in 1990 to 75% to 84% in 1998-2000). The incidence of MRSA among patients of outpatient departments is estimated to be 40%. In TSAR II program (2005) resistance rates were high in oxacillin (60%), and it had increased from TSAR I (1998) and may be spreading into outpatient settings. Data from a survey of >5,000 clinical isolates of *S. aureus* at the NTUH from January 1999 to June 2001 using brain-heart-infusion agar plus 4 mg/L of vancomycin showed results negative for vancomycin-intermediate or-resistant strains. We found 5 vancomycin-intermediate resistant strains by Vitek 2C AST-P545 kit in 2007. All tested strains showed the different susceptibility pattern as the antibiograms in table 1, 2 and 3.

Table 1. Antibiotics susceptibility test 2002 - Disk diffusion method (N=100)

Type	Antibiogram	No. strains	No. resistant antibiotics
1	P	9	1
2	Amp	1	1
3	AmpP	41	2
4	AmpPTip	2	3
5	AmpPTE	7	3
6	AmpPTob	8	3
7	AmpTeTob	1	3
8	AmpCltDaTe	6	4
9	AmpCltTeTob	4	4
10	AmpPTEtob	9	4
11	AmpCltEPTe	1	5
12	AmpCltNTeTob	3	5
13	AmpCltPTEtob	4	5
14	AmpCltDaEKNP	1	7

Table 2. Antibiotics susceptibility test 2005 - VITEK GPS112 method (N=196)

Type	Antibiogram	No. strains	No. resistant antibiotics
1	Tet	4	1
2	AmpPox-G	83	2
3	AmpPox-GT	5	3
4	AmpPox-GTst	2	3
5	AmpPox-GTst	56	3
6	AmpPox-GTst	14	4
7	AmpPox-GTst	4	5
8	AmpCltCltDaPox-G	1	5
9	AmpCltCltDaPox-GTst	3	7
10	AmpCltCltDaPox-GTst	2	8

Table 3. Antibiotics susceptibility test 2007 - VITEK 2C AST-P545 method (N=93)

Type	Antibiogram	No. strains	No. resistant antibiotics
1	P	10	1
2	Ra	1	1
3	PTs	26	2
4	PTstTs	27	3
5	PoxCimpCip	1	5
6	PoxCimpCipT	1	6
7	PoxCimpCipCmTs	4	7
8	PoxCimpCipCmVa	2	7
9	PoxCimpCipVtst	1	7
10	PoxCimpCmCmTs	1	7
11	PoxCimpCmCmVaTs	1	8
12	PoxCimpCmCmVtst	1	8
13	PoxCimpCmCmVtst	1	10
14	PoxCimpCmCmVtst	1	11

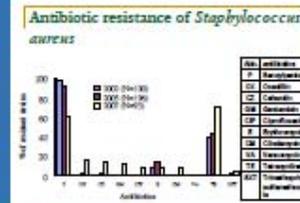


Fig.1

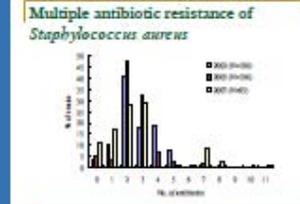


Fig.2

## CONCLUSION

Both tetracycline and oxacillin resistance strains were increasing from 39%, 43% to 70% and 0%, 3% to 17%, respectively (Fig. 1). MSSA (methicillin susceptible *S. aureus*) isolates from clinic and food poisoning outbreak sources showed the similar resistance to the antibiotics, tetracycline (40%) and erythromycin (33%) susceptible strains were the most common type. Multiple antibiotic resistance of *S. aureus* was increasing (Fig. 2). Our data showed that 96% (334/389) tested strains were multidrug resistant strains and the multiple antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* was increasing. In 2007, one strain showed resistance to 11 antibiotics in VITEK 2C AST GP-545 kit, the antibiogram was PoxCimpCmCipCmVaTetSt.

圖二、本局發表之壁報論文 - 台灣地區金黃色葡萄球菌食品中毒案件分離菌株之抗藥性

P-071



# Method for detecting viruses in water and the application to foodborne outbreaks in Taiwan

I.C. Yang, C.Y. Yu, S.W. Wang, Y.C. Chang, J.Y. Wang, D.Y.C. Shih  
Bureau of Food and Drug Analysis, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Add: 161-2, Kuen-Yang St., Nankang, Taipei, 11513, Taiwan, R.O.C  
Tel: 886-2-2653-1272  
E-mail: yangchien@ulfd.gov.tw

## ABSTRACT

Enteric viruses and enterically transmitted hepatitis viruses, such as norovirus, astrovirus, rotavirus and hepatitis A virus (HAV) are responsible for the vast majority of non-bacterial gastroenteritis or infectious hepatitis reported worldwide. These viruses are mostly transmitted via the fecal-oral route, from direct contact between people, or by ingestion of contaminated food and water. Since only a few viral particles may cause disease, the development of methods to concentrate viruses is crucial. In this study, we developed methods for concentration and detection viruses from drinking water. Known amounts of HAV (strain HM175) were inoculated into 100 mL and 1000 mL distilled water samples. For 100 mL samples, inoculated water was concentrated using Amicon ultra-15 centrifugal filter units. For 1000 mL samples, inoculated water was filtered through negatively charged membrane and the eluate was further concentrated using Amicon ultra-15 centrifugal filter units. Viral RNA was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) after RNA extraction. The limits of detection were  $5 \times 10^1$  genome equivalents/mL for 100 mL samples and  $10^1$  genome equivalents/mL for 1000 mL samples, which were equivalent to 1.7 and 3.3 genome equivalents per reaction, respectively. The developed methods were applied to the detection of viruses in 44 suspicious water samples from foodborne outbreaks in Taiwan and effectively detected GI norovirus, GI norovirus, enterovirus, and HAV in these samples.

## INTRODUCTION

Enteric viruses and enterically transmitted hepatitis viruses have been associated with many outbreaks of non-bacterial gastroenteritis or hepatitis in different countries every year. These viruses are transmitted by the human fecal-oral route either via contaminated food and water or person to person spread through body contact. Enteric viruses are highly stable in the environment, maintaining their infectivity even after exposure to treatment processes. Viral contamination of wastewater, recreational water, drinking water, irrigation water, ground or subsurface water has been frequently reported. Considering the low infectious dose of these viruses, only a small amount, present in the contaminated water, is usually sufficient to infect a human host. Thus, it is important to develop sensitive and efficient methods to detect viruses in water. Several concentration methods for viruses in water samples have been described. Among them, the filtration technique seems promising, since it enables the filtration of a large amount of water, while eliminating nonspecifically potential inhibitors present in the sample.

## MATERIALS AND METHODS

**Viral strain.** HAV RNA working reagent containing approximately 2000 genome equivalents of HAV strain HM175 (purchased from NIBSC) was used to spike into 100 and 1000 mL distilled water.  
**Concentration methods.** For 100 mL samples, inoculated water was concentrated using Amicon ultra-15 centrifugal filter units. For 1000 mL samples, inoculated water was filtered through negatively charged membrane and the eluate was further concentrated using Amicon ultra-15 centrifugal filter units. The procedure was shown in Figure 1.  
**RT-PCR assay.** One-step RT-PCR was performed in a reaction mixture (25  $\mu$ L) contained 1  $\mu$ L of RNA sample, 2  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ L of QIAAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 1  $\mu$ L of dNTP Mix, 1  $\mu$ L of Enzyme Mix and 13  $\mu$ L of RNase-free water. The RT-PCR program was as following: reverse-transcription at 50°C for 30 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 48°C for 30 s, 72°C for 1 min and final extension at 72°C for 10 min. The primers used in this study was shown in Table 1.  
**Electrophoresis and sequencing.** PCR products were analyzed on 2% agarose gel and electrophoresis was carried out. The PCR amplicons were directly sequenced by ABI 3730 XL DNA Analyzer. The resulting sequences were compared with other nucleotide sequences in GenBank.

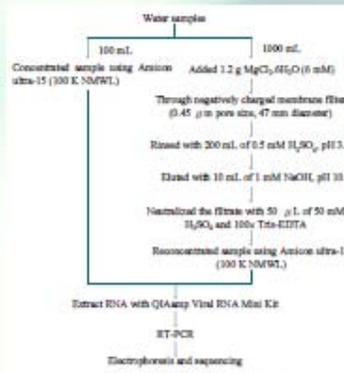


FIGURE 1. Steps to concentrate and detect viruses from water samples.

**Detection limit.** 100, 50, and 10 genome equivalents of HAV were inoculated into 100 mL and 1000 mL distilled water and obtained final concentrations of  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$  genome equivalents/mL for 100 mL samples and  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$  genome equivalents/mL for 1000 mL. The preparation was then handled by methods described above.  
**Determination of occurrence of viruses in water samples from foodborne outbreaks.** The occurrence of GI norovirus, GI norovirus, astrovirus, enterovirus, HAV and HEV in 44 suspicious water samples of foodborne outbreaks was determined by using the methods we developed.

TABLE 1. Primer pairs used in this study

Target virus	Primer name	Sequence 5' to 3'	Product size (bp)
HAV	HAV-F/R	5'-GAGCATGCGAAARHTGAG-3' 5'-CTCTGAAATGCACTTCAAC-3'	192
GI norovirus	GI-3K-F/R	5'-GCGCGCCGAA TTY GGA AAT GAA F-3' 5'-GCA ACC CAG GGA TGG TAC A-3'	330
GI norovirus	QF1F/R2R1R	5'-AGATTCAGTGGGATGATGATCTCTGAA-3' 5'-TGGAGCCATCTCTTCACTCA-3'	89
Astrovirus	MOR166F/R	5'-GGGATATTTTCTTTCATAC-3' 5'-AGATATCTCTCTTACTATG-3'	289
Enterovirus	EV23F/R	5'-GACGACACCCAAAGTA-3' 5'-CAAGCACTTCTTTTCCGCG-3'	400
HEV	HEV-F/R	5'-GCTTGAGCCGCGAGAGTACT-3' 5'-AGCCAGGAGAGCGAGCAAG-3'	406

## RESULTS AND DISCUSSION

**Concentration methods.** When using negatively charged membrane to concentrate virus, addition of cation to a freshwater sample was necessary in the virus adsorption to a membrane. The concentration of the cation also played an important role. The optimized concentration of cation in our study was about 6 mM. Higher and lower concentration both decreased adsorption.  
**RT-PCR assay.** The lowest detection limit of the RT-PCR assay was approximately  $10^1$  genome equivalent/reaction, as shown in Figure 2. The size of PCR amplicons was 192 bp.

**Detection limit.** Since the levels of human enteric virus in water are normally low, detection methods with a high sensitivity are needed. The detection limits of the developed methods were  $5 \times 10^5$  genome equivalents/mL for 100 mL samples and  $10^1$  genome equivalents/mL for 1000 mL samples, which were as low as 1.7 and 3.3 genome equivalents per reaction, respectively (Figure 3 and 4).

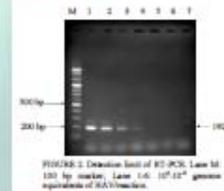


FIGURE 3. Detection limit of RT-PCR. Lane M: 100 bp marker; Lane 1-6:  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^3$ , and  $10^2$  genome equivalents of HAV inoculated.

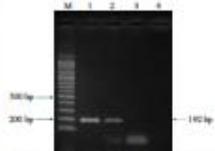


FIGURE 3. Detection limit for 100 mL samples. Lane M: 100 bp marker; Lane 1-6:  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^3$ , and  $10^2$  genome equivalents of HAV inoculated.

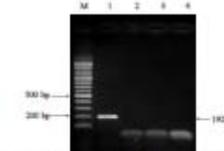


FIGURE 4. Detection limit for 1000 mL samples. Lane M: 100 bp marker; Lane 1-6:  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^3$ , and  $10^2$  genome equivalents of HAV inoculated.

**Occurrence of viruses in water samples.** By means of the developed methods, GI norovirus, GI norovirus, enterovirus and HAV were detected in real water samples. The results were shown in Table 2. At least one virus was detected in 23 samples (56.8%) and enterovirus were most frequently detected. The positive results of enteric viruses approved that the methods were effective for examining water samples.

TABLE 2. Occurrence of virus in water samples

Virus	No. of positive samples (%)	No. of negative samples (%)
GI norovirus	3 (6.8)	41 (93)
GI norovirus	11 (25)	33 (75)
Astrovirus	0 (0)	44 (100)
Enterovirus	15 (34)	29 (66)
HAV	1 (2.3)	43 (98)
HEV	0 (0)	44 (100)

## CONCLUSION

In summary, we developed sensitive RT-PCR methods for detecting virus in water samples. The developed methods were applied to the detection of viruses in 44 suspicious water samples from foodborne outbreaks in Taiwan and effectively detected GI norovirus, GI Norovirus, enterovirus, and HAV in these samples.

teamwork

圖三、本局發表之壁報論文 — 建立偵測水檢體中病毒之檢驗方法並應用於台灣地區之食品中毒案件