

衛生福利部疾病管制署委託研究計畫書

108 年度期末報告書

年 度： 108年

計畫名稱：沙門氏菌之跨物種間感染、監測與管理機制之研究

研究重點：人畜共通傳染病之跨物種間感染、監測與管理機制研究

負責單位：林口長庚醫院 分子感染症醫學研究中心

主持人：陳奇良

協同主持人：邱政洵

協同主持人：郭貞嫻

協同主持人：莊智賢

協同主持人：趙舜卿

協同主持人：陳建彰

協同主持人：賴明璋

研究助理：余敏嘉、劉大鵬

填報日期：108 年 12 月 9 日

新增型計畫： 一年 多年

多年期計畫：(指先前已獲同意辦理前面期程之延續計畫)

計畫有採用問卷調查或量表

目 錄

頁 碼

封面

目錄

審查意見修正對照表

壹、中文摘要 (1)

貳、英文摘要 (2)

參、報告內容

一、研究主旨 (3)

二、背景分析 (3)

三、實施方法及進行步驟 (6)

四、成果 (14)

五、總結 (19)

六、致謝 (22)

七、參考資料 (22)

八、預定進度及 Milestone (26)

九、108 年度期末報告繳交前應完成工作項目表 (27)

十、107 年度全程應完成工作項目表 (28)

十一、附表、附圖 (29)

附件一、受訪同意書

附件二、生活環境與接觸史問卷

附件三、部授食字第 1021951187 號附件(檢驗方法)

附件四、USDA Laboratory Guidebook

衛生福利部疾病管制署研究報告書—108 年度

壹、中文摘要

關鍵詞：沙門氏菌、血清分型、沙門氏菌檢測、病例對照研究、豬肉處理流程、抗藥性、全基因組定序

沙門氏菌(*Salmonella enterica*)是常見的人畜共通病原菌。為了探索台灣沙門氏菌跨物種感染人類的可能傳染途徑，我們持續以林口長庚醫院為中心，彙整北台灣地區沙門氏菌感染病患的臨床資料並執行未滿一歲沙門氏菌感染病患的 case-control study，以釐清可能的感染途徑；同時繼續追蹤食材之沙門氏菌帶菌率，並深入生豬肉處理流程中各個節點上的沙門氏菌帶菌率；以及分析這些採集得的菌株血清型、抗藥性和全基因組定序和親源圖譜的繪製。在本期 108 年度的研究中，我們分析 565 例臨床沙門氏菌如同 106-107 年度一樣主要感染 <5 歲的病患，主要症狀為腹瀉；而老人(≥60 歲)主要症狀則為菌血症。其中主要血清分群是 D 群和 B 群，其次是今年增多的 C2 群。在 1 歲以下的病例對照研究顯示“照顧場所處理生雞肉/豬肉/雞蛋會清洗”、“照顧者餵食小朋友前曾處理肉類(雞肉/豬肉)食材”和“照顧場所購買豬肉的主要來源為傳統市場”等因素具有較高強度的感染風險值。我們以最佳靈敏度(1.4×10^1 CFU/100 cm²)的可檢出率為檢測沙門氏菌的基礎，證實了生豬肉處理的流程，從屠體、分切、運送，直到販售等各個節點的沙門氏菌帶菌率有被放大的現象，而且冷鏈(全程低溫約 4-15°C)處理的生豬肉、工具(如刀具、砧板、絞肉機)以及操作人員手部的帶菌率都明顯比傳統生產鏈(僅屠宰場設為 20°C，其餘皆為室溫)的低，尤其傳統市場生產鏈人員手部採樣會隨著時間快到當天營業結束前，從 0% 增加到 66.7%，且在當天營業結束前從多個單一檢體中分離出 2 種不同血清型之沙門氏菌，證實有交叉汙染之現象。作為背景值我們於 108 年度檢測了某縣市之市場沙門氏菌帶菌率，發現以生豬肉的帶菌率最高(32.1%，17/53)，其次是生雞肉(8.3%，2/24)。這些菌株有些應要特別注意，因為對 ceftriaxone 和 ciprofloxacin 具有高抗藥性，其血清型主要為 Goldcoast、Anatum。我們更進一步分析 Anatum 和 Goldcoast 的 WGS 和遺傳親緣性圖譜，結果證實市場肉品、豬肉生產鏈的檢體和臨床病人所分離的沙門氏菌菌株間的親緣性極為相近(<20 SNPs)，因此，推測可能來自相同的汙染來源。本研究結果希望將來能有助於沙門氏菌的防治策略和實地監測等公共政策的制定，以阻斷可能跨物種傳染的發生，進而降低人類透過食物途徑感染沙門氏菌的機會。

貳、英文摘要

Keywords: *Salmonella enterica*, serotyping, *Salmonella* identification, case-control study, pork meat processing, drug susceptibility, whole genome sequencing

Salmonella enterica is a common zoonotic pathogen. For exploring the potential infection routes of *Salmonella* cross-species transmission barrier humans, we continued to analyze the clinical data of *Salmonella*-infected patients admitted to the Chang Gung Memorial Hospital in northern Taiwan, to practice a case control study of patients with *Salmonella* infection under 1 year old, to detect *Salmonella* contamination rates in foodstuffs and at nodes of pork processing, to perform *Salmonella* serotyping, drug susceptibility test, and whole genome sequencing (WGS) and phylogenetic analysis. In this third year study in 2019, we analyzed 565 cases of clinical *Salmonella* infections, and the results similar to those in previous two years showed that leading *Salmonella* infection patients were <5 years old with the main symptom of diarrhea; however, the main symptom to the elderly (≥ 60 years old) was bacteremia. The main *Salmonella* serogroups are group D and group B, followed by group C2 which has been increasing in this year. The <1-year-old case-control studies showed that the factors of “accessing the place where the raw chicken/pork/egg is processed”, “the caregiver had ever processed raw meat (chicken/pork) before feeding the children” and “the main source of pork purchased from traditional market” have high risk to get infection. With optimizing sensitivity rate of 1.4×10^1 CFU/100 cm² for detection of *Salmonella*, we confirmed that the *Salmonella* contamination rate throughout pork processing, from carcass, cutting, shipping, to sales, etc., was getting magnified, and the rates of meat, tools (such as knives, cutting boards, meat grinders) and operator's hands monitored in a cold-chain meat processing factory system (about 4-15°C) were lower than those in traditional production chain (mainly at room temperature but 20°C only during meat processing in slaughterhouse). In particular, the increasing rate from 0% to 66.7% on the operator's hands detected from the beginning to the end of daily traditional marketing was observed. In monitoring *Salmonella* contamination in middle Taiwan in 2019, raw pork showed highest rate (32.1%, 17/53), followed by raw chicken (8.3%, 2/24). Noteworthily, some of those *Salmonella* isolates were highly resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin, including serotypes Goldcoast and Anatum. We further analyzed the WGS and phylogenic tree of Anatum and Goldcoast, and the results confirmed that *Salmonella* strains isolated from market foodstuffs, pork processing chain system and clinical patients shared with highly similar genetic background (< 20 SNPs), implicating that they likely came from the same original sources. This study confirmed the linkage of clinical *Salmonella* isolates with nonclinical strains isolated from foodstuff and meat-processing environment. The finding would contribute to the development of public policies such as *Salmonella* prevention strategies and on-site monitoring in the future to block the possible occurrence of cross-species infections, thereby reducing the chance of *Salmonella* infection to humans.

參、報告內容

一、研究主旨：

總目標：研究沙門氏菌重要血清型於人類、寵物和畜養動物之地理分佈圖及細菌親緣性相關圖，並據此做為跨物種感染之證據，同時提出阻斷跨物種感染的方式，並評估三年的監控成效，以期能降低沙門氏菌的感染。

計畫之目的第三年(108 年度)第一～四季：

1. 透過全基因體序列分析(WGS)，持續進行沙門氏菌多重抗藥性(MDR)重要血清型於市場採樣陽性與病患分離菌株之基因親緣性評估。
2. 統計分析 108 全年度長庚臨床沙門氏菌之資料，並繪製出感染熱點之地圖。
3. 基於第二年的市場採樣結果繼續往市場端上游追溯，檢測豬隻屠體在出屠宰場後運輸、分切處理及販售處之汙染比例，評估可能放大汙染及交叉汙染之節點，推估出屠宰場到市場之處理流程是否具有放大沙門氏菌帶菌與感染發生之可能性。
4. 分析未滿一歲嬰幼兒之 Case-Control Study，評估未滿一歲感染沙門氏菌之嬰幼兒與對照組健康嬰幼兒之暴露風險比(Odds Ratio)，以作為未來防治及阻斷嬰幼兒感染沙門氏菌之參考。

二、背景分析：

沙門氏菌(*Salmonella enterica*)是常見的人畜共通病原菌，至少有 2500 種不同的血清型，在全世界普遍造成動物和人的感染。其中以廣泛宿主特性的非傷寒沙門氏菌的感染，包括鼠傷寒沙門氏菌 (*S. enterica* serovar Typhimurium; 簡稱 *S. Typhimurium*)和腸炎沙門氏菌 (*S. Enteritidis*)，是近年來感染人類最常見的兩種血清型菌株，主要導致腹瀉和食物中毒事件。另外在嚴重的感染症上，豬霍亂沙門氏菌(*S. Choleraesuis*)也曾是常見的血清型，導致敗血症和非腸道感染。沙門氏菌最常發生在 5 歲以下嬰幼兒，因食入受汙染的食物而感染。特別對小孩、老人、和免疫下降的人較易造成嚴重的感染，甚至對畜產動物牛和豬，引起腸炎、敗血症、關節炎、和流產等症狀。美國每年至少有 1 百萬沙門氏菌感染事件(salmonellosis)發生，其中 19,000

人住院和 400 人死亡，並分離 48,000 株沙門氏菌(<http://www.cdc.gov/salmonella/>)。台灣如以此比例來估算，每年至少有 10,000 株沙門氏菌被分離，所以至少有 26 萬人感染沙門氏菌(依台灣疾管局估計 2001-2003 年的流行病學資料)。

台灣只將傷寒(由 *S. Typhi* 所感染)和副傷寒(由 *S. Paratyphi A* 所感染)歸類在法定傳染病，其年平均感染人數分別只有 45 例和 12 例，其中 1/3 以上還是境外移入(台灣疾管局估計)。顯然主要的感染是以非傷寒沙門氏菌為主，尤其是 *S. Enteritidis* 和 *S. Typhimurium*。然而台灣尚未將非傷寒沙門氏菌的感染列入監控的目標，不像相當重視沙門氏菌感染的歐美國家，分別設有監控系統，如歐洲的 Salmnet 和美國的 National *Salmonella* Surveillance System 與美國疾病管制局的即時監測網 PulseNet [Swaminathan et al., *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:382]。

目前檢測沙門氏菌的方法有很多種，包括傳統血清學、PFGE、MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight)、multiplex PCR、MLST (multi-locus sequence type)、和 WGS (whole genome sequencing) [Hellberg et al., *J Microbiol Methods.* 2012 Dec;91(3):448; Scaria et al., *Mol Cell Probes.* 2008 Aug;22(4):238 ; Chiou et al., *Int J Food Microbiol.* 2015 Dec 2;214:1; Bell et al, *Microbial biotechnology.* 2016; 9:279-292]。其中傳統血清學的檢測最為簡便與快速，但只能做分群，其中常見的血清分群包括從 A 群到 E 群，其它還有較不常見的分群(如從 F 群到 I 群等)。如需要進一步分析其血清分型，則可簡便的執行 multiplex PCR，但仍有許多血清分型之間的重疊，需要其它方法的協助，如 PFGE。雖然 PFGE 的血清型判讀正確性最高，但仍無法完全代表流行病學上菌株親緣的關聯性。因此，需要全基因體序列(WGS)分析比較，才能明確說明菌株間的親緣性。然而，WGS 的費用最為昂貴。MLST 也可協助 multiplex PCR 判讀血清分型的不足，如 *Enteritidis* 與 *Dublin* 無法以 multiplex PCR 區分，但可以 MLST 區分其序列分型分別是 ST11 和 ST3734。然而 MLST 的費用則較為昂貴，而且也有很多無法區分的血清型，如血清型 *Anatum*、*Vejlec* 和 *Nglor* 既無法以 multiplex PCR 區分，也無法以序列分型區分，因為它們都是 ST64，因而必須藉助 PFGE 才能做區分。另外，MALDI-TOF 的檢測雖然速度快且便宜，只能做沙門氏菌種的重疊，而無法做血清分型的判讀。然而就我們初淺的認知，MALDI-TOF 的使用仍有缺點，因為其檢測的如同 16S rRNA 的分析，對於與 *Shigella* spp.、*Escherichia coli*、*Streptococcus pneumoniae* 和 other members of *S. oralis/mitis* group 的區分上，

仍有疑義，而還需要配合其它方法的佐證(如血清學的驗證和分子的檢測) [Wieser, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012;93:965-74]

近年來我們的研究團隊在研究沙門氏菌感染的臨床病例數上顯示最多是 Serogroup D (其代表菌株是 *S. Enteritidis*, 佔約 98%) 的感染, 其次是 Serogroup B (其代表菌株是 *S. Typhimurium*, 佔約 80%) [Su et al., *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:1086]。先前還發現 *S. Enteritidis* phage type PT34 有較盛行的趨勢, 因為帶有接合生殖特性的質體 pSE34 在最常見的 PT4 菌株中傳遞, 因而轉換成 PT34 [Chen et al., *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2009;57:274]。另外, 也研究了在多重抗樣性 *S. Choleraesuis* 中基因轉錄與抗藥性的相關性 [Chen et al., *Food Research International* 2012;45:973], 以及帶有抗藥性質體的演化機制 [Chen et al., *J Microbiol Immun Infect.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.11.004>]。

沙門氏菌造成眾多的感染病例, 已增加許多醫療資源的花費。即便偶有大流行或群聚感染, 仍以散發性的個案為主, 所以非常不容易被偵測或追蹤其傳染途徑。因此, 當務之急是需要一跨領域研究團隊, 結合感染、微生物、及獸醫等專業, 配合快速、正確的診斷方式, 建立從農場到餐桌(from Farm to Table)、從農場到排泄(from Farm to Flush)、以及從寵物到飼主(from Pet to Human)的監測系統, 來描繪沙門氏菌在人類、畜養動物和寵物上的分佈風險圖像與沙門氏菌親緣關係之地域圖譜, 以及可能感染的關鍵點, 以期能藉由本計畫所提出和施行的防治策略和阻斷方式, 提供有效降低人類感染沙門氏菌的資訊。

三、實施方法及進行步驟：

第三年

1. 延續第一年的研究調查方法並往上游追溯，並檢測生豬肉生產流程可能汙染環節及交叉汙染可能性：

因 *S. Anatum* 在近兩年竄升到台灣臨床上沙門氏菌患者第三位最常被分離之血清型，明顯有群聚傳染(outbreak)的問題。並且在本計畫之 106 年度及 107 年度之市場採檢結果顯示，在生雞肉和生豬肉檢體中也被檢測出數株 *S. Anatum* 菌株，因此，值得被列為檢測的重點目標。本年度將延續前兩年之計畫成果，繼續往市場上游追溯，並透過某縣市衛生局及民間機構之協助，檢測豬隻屠體在轉運出屠宰場後之運輸流程中、分切處理及販售處之汙染比例，評估可能放大汙染及交叉汙染之節點，以及推估可能汙染環節及交叉汙染及放大汙染之可能性。

- i. **市場端上游之採樣與檢測可能之汙染節點及比較：**因本計畫前兩年市場採樣的結果均顯示市場之生雞肉、生豬肉有高比率之沙門氏菌檢出率，傳統市場為 66.7% (82/123)，超級市場為 19.5% (8/41)。所以推測市場肉品為重要之沙門氏菌感染來源之一。其中，又以傳統市場生豬肉之檢出率為最高(76%, 57/75)，和超級市場生豬肉之檢出率(5%, 1/20)有顯著差異(P -value < 0.001***)。因此，108 年度計畫的採檢重點，將集中在生豬肉之汙染流程上，再往市場端上游追溯生豬肉運輸端、分切端等可能汙染之環節(表一)。

表一、單次預計採檢之生產線節點(視實際環境調整)

節點	單次單節點預計採檢數量
出屠宰場之豬隻屠體表面	20-40
豬隻屠體運輸車/運輸屠體之載具	20-40
預冷室之屠體表面(CAS 生產線)	20-40
分切豬隻屠體之砧板/刀具	20-40
已完成分切之生豬肉(取樣 25g)	10-20
分切作業人員手部採樣	20-40

運送至市場端之運輸車/載具	20-40
市場端處理肉品用具(砧板/刀具/絞肉機)	20-40
市場端分切之不同部位之生豬肉(取樣 25g)	10-20

ii. **某縣市豬肉運輸端、分切端**：委請某縣市衛生局協助，某縣市衛生局將協助計畫採檢某縣市傳統市場豬肉生產線(豬肉屠體出屠宰場後運輸、分切及市場攤販)。因本計畫 108 年度之經費與人力均十分有限，目前預計於 108 年度夏季採檢一次，每次每個環境節點分別以無菌海綿採樣約 20-40 份樣品，分切之肉品約採樣 10-20 份樣品(表一)，採樣數量視實際環境做調整。採樣後培養分離沙門氏菌菌株並統計各節點污染率，分析不同節點間的污染率以比較何者較有可能使肉品交叉污染及放大污染。

iii. **北台灣 CAS 認證之肉品公司**：相較於某縣市傳統市場之生產線，我們計畫再找一間位於新北市經過 CAS 認證之北台灣肉品公司(全程冷鍊)作為傳統市場生產線採檢之對照。我們一樣於 108 年度夏季採檢一次，每次每個環境節點分別以無菌海綿採樣約 20-40 份樣品，分切之肉品約採樣 10-20 份樣品(表一)，採樣數量視實際環境做調整。採樣後培養分離沙門氏菌菌株並統計各節點污染率，比較傳統市場生產線與 CAS 認證之全程冷鍊肉品公司各節點之污染率之差異，並評估可能的重要污染節點。

2. 延續前兩年之問卷 Case-Control Study

基於前兩年問卷收案之基礎，以及 107 年度居家採檢曾從嬰幼兒病患食用之米精檢體中分離出與感染同血清型之沙門氏菌，由於未滿一歲嬰幼兒飲食較單純，推測嬰幼兒感染沙門氏菌可能和照顧者的照顧及餵食習慣有關。依照 107 年度 190 名未滿 5 歲兒童及嬰幼兒問卷之風險比(odds ratio)分析結果，其中「收案對象白天主要由何者照顧/祖父母或其它長輩」之 odds ratio 為 1.70 (患者 28%、健康對照組 19%)，及「照顧場所及住家的飲用水過濾加熱方法/濾水器+瓦斯爐煮沸」之 odds ratio 為 2.00 (患者 39%、健康對照組 24%)。我們推估未滿 1 歲嬰幼兒在成人照顧及餵食習慣的差異 odds ratio 會更明顯，以 107 年度之問卷結果來估算若需取得更高之 statistical significance and power，病患組及對照組之比例需為 1:4。Sample size 的評估方面，林口長庚 106 年度全年未滿 1 歲之沙門氏菌收治患者為 64 名、

107 年度 1-10 月為 73 名，因部份患者只在急診或門診做 swab 採檢糞便培養並未住院難以追蹤並收案，且考量 108 年度經費及人力非常有限，經評估預計於 108 年度集中收案 20 名未滿 1 歲感染沙門氏菌之嬰幼兒作為病患組，及收案 80 名並無腸胃道感染症狀之健康嬰幼兒作為對照組。問卷內容除了延續前年的內容之外再針對食材購買來源及餵食習慣等做更進一步之分析，以釐清未滿 1 歲之嬰幼兒可能的沙門氏菌感染途徑。

3. 持續分析前兩年度從食物分離出之沙門氏菌與病人分離菌株之親緣性

持續以全基因體定序(WGS)分析在前兩年度中從食物與病人分離之 *S. Anatum* 菌株之親緣性關係，以評估食品沙門氏菌污染和病人端感染之關係。

4. 研究方法與材料:

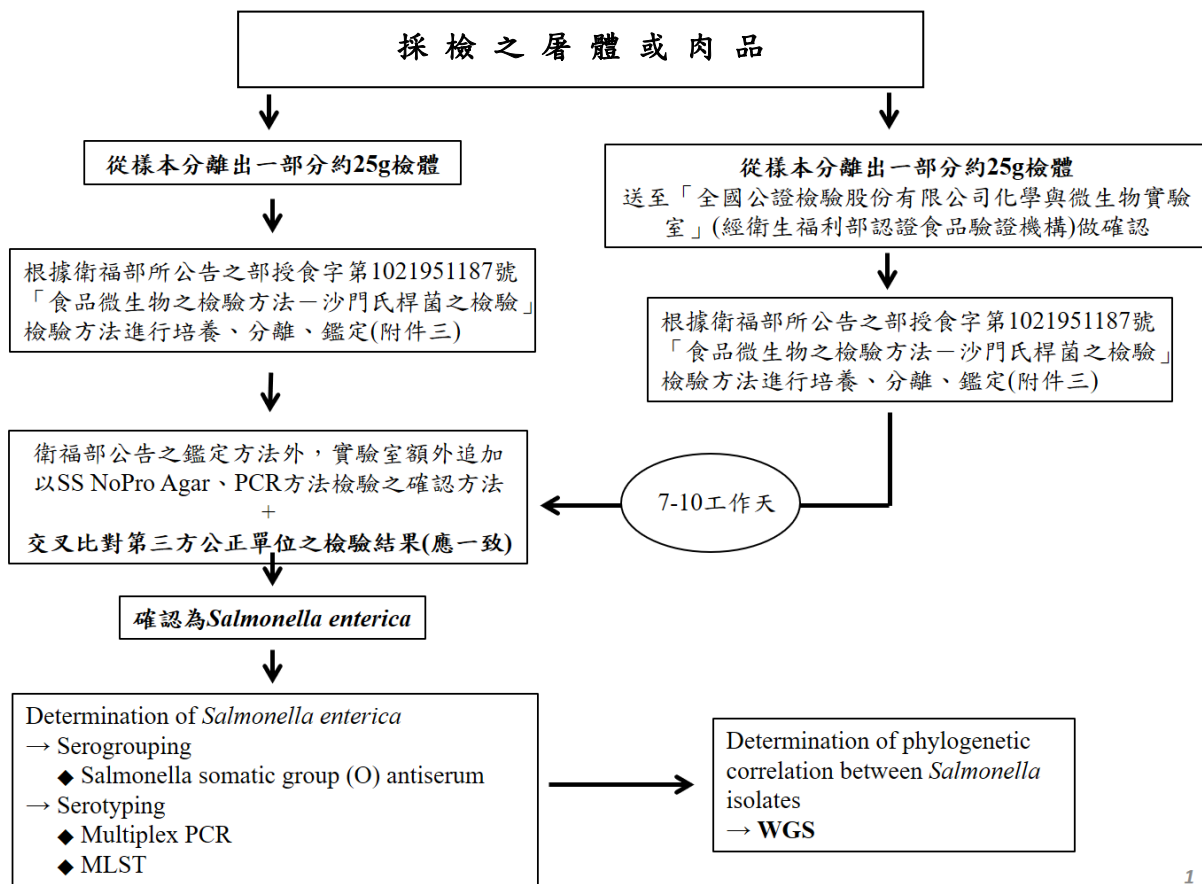
I. 沙門氏菌感染的前瞻性臨床資料彙整與菌株收集

1. 臨床病例資料之調查:本年度將延續前兩年之計畫，繼續前瞻性地彙整 2019 年 1-9 月於長庚臨床病理檢驗中心所記錄有關沙門氏菌感染之病例報告與感染病人的居家地理位置等資料。
2. 保護隱私與機密性:我們將依循長庚醫療財團法人林口院區長庚紀念醫院人體試驗委員會[IRB: 201601178B0]保護隱私與機密性之規範保護受訪者。將以研究代碼代表受訪者的身分，除此代碼之外，都不會顯示受訪者的姓名、身分證字號、住址。受訪同意書及問卷都將上鎖，非相關人員都無法取得。對於受訪者訪查的結果及診斷，研究主持人將持保密的態度，小心維護受訪者的隱私。如果發表研究結果，受訪者的身分仍將保密。請受訪者亦瞭解若簽署同意書即同意受訪者的訪查紀錄可直接受監測者、稽核者、研究倫理委員會及主管機關檢閱，以確保本研究過程與數據符合相關法律及法規要求。上述人員並承諾絕不違反受訪者的身分之機密性。

II. 沙門氏菌之培養、分離與鑑定

1. 生肉品及一般食品沙門氏菌之培養與分離:生肉品及一般食品根據衛福部所公告之部授食字第 1021951187 號「食品微生物之檢驗方法—沙門氏桿菌之檢驗」檢驗方法進行培

養及分離(附件三)。因食安是重要的議題，除自行依照上述公告之方法檢測外，另會將同一份肉品檢體經由第三方由衛福部認證之食品檢驗公司(衛授食字 1061102274)，檢測肉品中是否帶沙門氏菌，以謹慎確認檢驗的可信度(圖一)。



1

圖一、107 年度市場採檢、病患家中剩餘食物之沙門氏菌培養、分離、鑑定與分析之流程圖。

下表為經三估單比價後選定之第三方檢驗單位分離沙門氏菌之靈敏度測試(sensitivity test)，實驗結果顯示偵測靈敏值最佳可被檢測菌數為 22CFU/25g 豬絞肉(表二)。

表二、第三方檢驗單位肉品分離沙門氏桿菌之靈敏度測試

Sample	檢測結果
冷凍豬絞肉 25g (不添加菌液)	陰性
冷凍豬絞肉 25g + 22 CFU 菌液	陽性
冷凍豬絞肉 25g + 112 CFU 菌液	陽性
冷凍豬絞肉 25g + 225 CFU 菌液	陽性

2. 屠體表面和環境沙門氏菌之採樣、培養與分離:

主要依據美國農業部 Food Safety and Inspection Service (USDA Laboratory Guidebook;

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/700c05fe-06a2-492a-a6e1-3357f7701f52/MLG-4.pdf?MOD=AJPERES>)之採樣、檢測、分離及培養沙門氏菌之方法(附件四)

(1) 採樣前的準備工作:

1. 將沿著虛線撕開無菌採樣袋(Nasco Whirl-Pak™ Speci-Sponge™ Bags, Macalaster Bicknell Co., USA)金屬線上方的袋角處，利用兩旁的金屬線將採樣袋拉開。
2. 將 10ml BPW (Buffered Peptone Water) Broth 加入內含海綿之無菌採樣袋中，並從採樣袋外小心按摩海綿塊直到它整個軟化。
3. 將採樣袋袋口向下對折 3-4 次，並由金屬絲扣住採樣袋封口以確保海綿塊保存於密封狀態。
4. 在採樣袋仍是關閉時，小心將海綿塊擠壓至採樣袋上方，使打開採樣袋時，整個軟化的海棉塊是朝上且容易取出的。
5. 在採樣進行前，將內含 10ml 之 BPW 浸濕的海棉塊採樣袋置於 4°C 冰箱，採樣前一小時取出置於室溫環境中回溫。

(2) 環境/豬隻屠體表面擦拭檢體採樣方法:

1. 先在採樣袋上標記採樣環境/豬隻屠體編號。
2. 於環境/豬隻屠體表面，採檢腹部(belly)、腿臀部(ham)及頸頰部(jowl)等三處，將已滅菌之中央挖空 10x10 cm² 之採檢模板貼住採樣區域，用同一海棉塊的同一面各做垂直方向 10 次、水平方向 10 次的塗抹擦拭。
3. 擦拭完後將海綿塊放回採樣袋中，避免手部碰到袋子的內側，排除採樣袋內多餘的氣體，由袋口向下對折 3-4 次，並由金屬絲扣住採樣袋，可確保海綿塊完整浸泡於 BPW Broth 中而不受外部污染。
4. 更換手套及檢測材料，以執行下一份採檢。
5. 保存於維持冷藏(約 4-6°C)之攜帶式冰箱中迅速送回實驗室。

(3) 採樣檢體和增菌培養之方法(USDA 標準培養法):

1. 直接於已採檢完成之採樣袋中加入 50ml BPW pre-Enrichment，均勻按壓使海綿和 BPW Broth 混合均勻，於 37°C 恆溫培養箱中，以 150 rpm 轉速之震盪培養 24 小時。
2. 取 100 µl 預增菌液放入 10ml 的 mRV Broth (Modified Rappaport-Vassiliadis Broth) 選擇性培養液中，於 42°C 恆溫培養 24 小時。
3. 吸取 10µl RV Broth 增菌液，塗抹到 XLD Agar (Difco BD, USA)及 SS NoPro Agar (HardyCHROM, USA)上三區畫線，於 35-37°C 恆溫培養箱中恆溫培養 18-24 小時。
4. 挑取 3-5 個疑似沙門氏菌黑色菌落進行 Salmonella 確認鑑定及血清(Serogroup)、血清型(Serotype)鑑定。

(4) 聚合酶連鎖反應試驗:

除使用傳統血清學方法鑑定沙門氏菌外，可進一步再確認是否為沙門氏菌，可以使用 PCR 檢測方法，其中以所有血清型菌株普遍都有 *invA* 和 *rpoD* 兩基因[Barbau-Piednoir et al., *Microbiol Biotechnol.* 2013;97:9811.]，做為最主要檢測的對象(表三)。此雙基因檢測系統可以減少因只檢測單一基因所產生的偽陽性。並重複 PCR 之檢測，以確認結果具有再現性。

表三、通用型引子之序列。

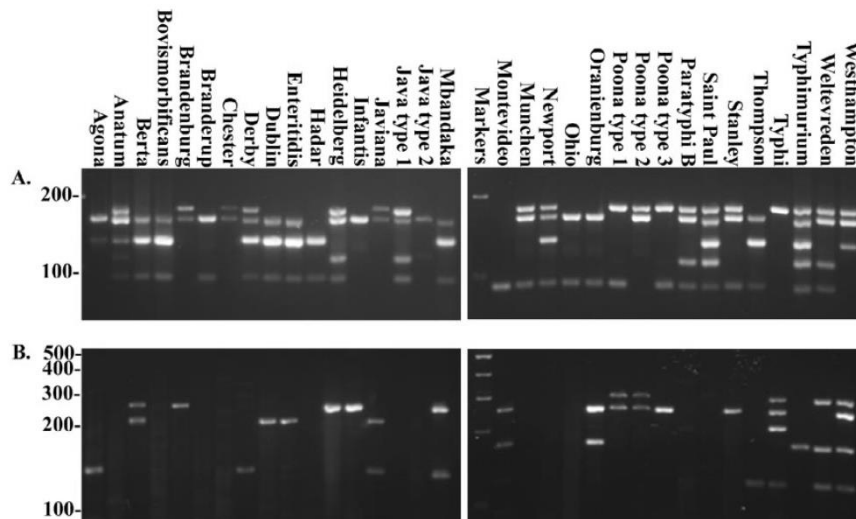
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>invA</i> -F	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244
<i>invA</i> -R	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	
<i>rpoD</i> -F	ATACCACCAGCACCGATGAAG	209
<i>rpoD</i> -R	GTATTCGGCAACGGAGCATTG	

(5) O 抗原玻片凝集試驗法:

將待測沙門氏菌之單一菌落(single colony)，以沙門氏菌單價 O 群血清(Difco BD, USA, O-Antiserum, Group A、B、C1、C2、D1、E、G、H、I、Vi 等)進行玻片凝集試驗，以確定其血清群(Serogroup)。

(6) multiplex PCR 血清分型(serotyping):

依據 Kim 等人的方法[Kim et al., *J Clin Microbiol.* 2006;44:3608]，利用 Multiplex PCR 之兩組引子 STM 和 STY (表四)，檢測沙門氏菌的血清分型(serotyping)，其中 30 種臨床最常見的血清型(serotypes)可被檢測出(圖二)，包括最常見的前兩種 *S. Enteritidis* 和 *S. Typhimurium*。使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 萃取全基因組 DNA，再以 Multiplex PCR 進一步確認此菌落之 Serotypes。我們將特別注意那些具有相同血清分型沙門氏菌的組合，包含人與寵物、或人與畜養動物、或人與飲食食材之間，或是具有地理感染熱點連結相關性的菌株組合。



圖二、以 Multiplex PCR 方法檢測沙門氏菌不同血清分型的圖譜。(A)使用 STM multiplex primers。(B)使用 STY multiplex primers。(節錄自 Kim et al., *J Clin Microbiol.* 2006;44:3608)

表四、Chromosomal regions of *S. enterica* serovars Typhimurium LT2, Typhi CT18, and Enteritidis (PT4) used to create primers for multiplex PCR. (節錄自 Kim et al., *J Clin Microbiol.* 2006;44:3608).

TABLE 2. Chromosomal regions of *S. enterica* serovars Typhimurium LT2, Typhi CT18, and Enteritidis (PT4) used to create primers for multiplex PCR^a

Assay	NCBI accession no.	Primer	Reaction concn (pM)	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
STM 1	AE008729	STM0716F	1	AACCGCTGCTTAATCCTGATGG	187
		STM0716R	1	TGGCCCTGAGCCAGCTTTT	
STM 2	AE008758	STM1350F	3	TCAAAAATTACCGGGCGCA	171
		STM1350R	3	TTTTAAGACTACATACGCGCATGAA	
STM 3	AE008735	STM0839F	1	TCCAGTATGAAACAGGCAACGTGT	137
		STM0839R	1	GCGACGCATTGTTTCGATTGAT	
STM 4	AE008913	STM4525F	1	TGGCGGCAGAAGCGATG	114
		STM4525R	1	CTTCATTACGCAACTGACGCTGAG	
STM 5	AE008913	STM4538F	2	TGGTCACCGCGCGTGAT	93
		STM4538R	2	CGAACGCCAGGTTTCATTTGT	
STY 1	AL627266	STY0311F	0.8	TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG	301
		STY0312R	0.8	GAGAGTCATAGCCCACACCAAAG	
STY 2	AL627273	STY0346F	0.8	GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA	262
		STY0347R	0.8	AAGAGTTGCCTGGCTGGTAAAA	
STY 3	AL627273	STY2299F	3	AATCCCCCCCCCTCAAAAA	220
		STY2300R	3	GGTACACGTTTACTGTTTGCTGGA	
STM 6	AE008879	STM3845F	0.8	ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT	181
		STM3845R	0.8	GAAGGTCCGGATAGGCATTCT	
STY 4	AL627273	STY2349F	1	AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG	124
		STY2349R	1	TGCGGCCAGCTGTTCAAAA	
PT4	AF370716	PT4 F	4	GGCGATATAAGTACGACCATCATGG	225
		PT4R	4	GCACGCGGCACAGTTAAAA	
STM 7	AE008795	STM2150F	4	CATAACCCGCTCGACCTCAT	101
		STM2150R	4	AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG	

^a The chromosomal regions of *S. enterica* serovars Typhimurium LT2 (STM), Typhi CT18 (STY), and Enteritidis (PT4) were used to create primers for multiplex PCR.

(7) MLST 序列分型(serotyping):

如上述之 MPCR 方法無法分辨出菌株為何種血清型(Serotype)，則依據 MLST 網頁 (<http://ppt.cc/f6c9sx>)所使用的七種沙門氏菌基因(*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA*, *thrA*)作為定序的目標，並依據其序列分型之 ST Type，查詢 EnterBase Salmonella Databases 網頁 (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>)，以對照該 ST Type 為何種血清型(Serotype)

(8) 全基因體定序(WGS):

因 *S. Anatum* 在近兩年竄升到台灣沙門氏菌患者第三位最常被分離之血清型為一明顯之 outbreak，因此本年度將繼續延續前兩年計畫內容，利用次世代基因定序方法(NGS, next generation sequencing;大約 50 copies of coverage/genome; miSeq, Illumina™)，分析 *S. Anatum* 來自病人端的菌株與肉品分離菌株全基因體序列之間的親緣性關係，以做為可能感染來源之佐證。

(9) 統計學：利用 SPSS 軟體 v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)分析感染沙門氏菌的風險值。計算各個可能影響的因子(items)的勝算比(Odds Ratio, OR)，以及較低和較高的 95% 信賴區間(Confidence Interval, CI)等數值，以評估各個因子的相關強度的大小。

四、成果：

1. 108 年(西元 2019 年)1-9 月臨床沙門氏菌感染相關的分析

108 年 1-9 月臨床沙門氏菌檢體來源及血清分群之分析：108 年 1~9 月之臨床沙門氏菌感染資料已整理(表五)，共有 565 株菌株被分離。因執行進度報告，本次只統計到 9 月份。目前個案主要來自 1-4 歲病患(佔總數之 46.9%)的糞便樣品(佔 1-4 歲之 89.4%)，主要屬於血清分群 D(佔 42.3%)。全年齡病患 (總數 565) 的樣品主要來自糞便，其中的血清群分布主要為 D 群(佔 42.4%)，但最值得注意的是第三高比率的 C2 群(佔 13.1%)，其中主要來自 1-4 歲(22/74=29.7%)及<1 歲(19/74=25.7%)之族群。

108 年 1-9 月與 106 年和 107 年度比較臨床沙門氏菌感染人數依據月份和當月氣溫之差異：依據在 108 年 1-9 月與 106 年和 107 年度台北地區各個月份的平均溫度(溫度數值取自林口觀測站)，比較感染人數及其年齡(以五歲為界線)，發現感染人數在全年齡的分佈上，隨著月份在五月至十月之間時，氣溫較高(在 25°C 以上)，其感染人數也隨之增加(圖三)。特別的是 106 年九月和 108 年 2 月氣溫比往年還高，同時也反應出較高的沙門氏菌感染人數。另外依據不同年齡層，其感染人數也有此趨勢(圖四、圖五)，尤其以成人感染人數在六、七月則明顯增多。感染波峰(圖五)，未滿五歲之兒童感染人數高峰大約集中於八、九月(圖四)。此兩高峰期的差異可能原因如下：(1)六月端午節後，氣溫持續高溫，而且六、七月時各級學校開始進入暑假，學生及其家人的旅遊活動隨之增加，也因此增加了食物中毒的機會。(2)八、九月時天氣除了持續高溫之外，各級學校即將結束暑假或是新學期剛開始，旅遊活動再次增加，因此食物中毒的機會也增加了。沙門氏菌主要分離來自<5 歲(尤其是 1-4 歲)的病患。107 年度比 106 年度有減少的趨勢，其中 1-4 歲病患數減少最為明顯。然而<1 歲的感染人數卻明顯增加。

108 全年度未滿一歲感染沙門氏菌 Case-Control Study 之風險評估

為了評估 108 年度可能感染沙門氏菌的風險因子，我們針對未滿一歲之嬰幼兒沙門氏菌感染病患(n=20)，設計問卷類別(包括接觸史、生活環境、飲食和購買來源)，以評估感染沙門氏菌的風險，並詢問北北桃地區健康同年齡層之嬰幼兒作為對照(n=80)，共 100 位。因未滿一歲之小小孩在飲食、環境上均比較單純，今年度設定收案此一年齡層做 Case-Control Study，以釐清未滿一歲之小小孩可能由什麼途徑感染沙門氏菌。目前的問卷收案結果顯示在生活環境上，以”照顧場所購買雞蛋的種類/散裝零售蛋(未經洗選流程)”和”照顧場所購買豬肉主要來源/傳統市場”有較高強度的感染風險評估值[OR>3.5；Lower 95% CI>1.1](表六)；在飲食上，以“照顧場所處理生雞肉、豬肉、雞蛋會清洗”和“照顧者餵食小朋友前曾處理其他肉類(雞肉/豬肉)食材”，以及在食材購買來源上，以“傳統市場(早市、黃昏)”有較高強度的感染風險評估值(表六)。

108 年度傳統市場、超級市場食材採檢之沙門氏菌檢出率及血清型

作為本年度生產線採檢之背景資料，108 年度共採檢某縣市傳統市場、超級市場食材 133 件，其中沙門氏菌檢出率以傳統市場生豬肉(37.8%，14/37)為最高，其次為生牛肉(50.0%，1/2)和生雞肉(22.2%，2/9) (表七)。其檢測的沙門氏菌血清型中以生豬肉呈現最多樣化，包括 Anatum (1 例)、Derby (6 例)、Kentucky (2 例)、Livingstone (1 例)、London (4 例)、Mbandaka 和 Weltevreden (2 例)。其它食材所檢測的血清型依序為生牛肉的 Anatum 和生雞肉的 Kentucky。其它如全蛋(10 例，每例 6 顆混測)、蔬菜(32 例)和水果(7 例)則均未檢測出沙門氏菌。

108 年度檢測某縣市之食品業用未滅菌瓶裝蛋液

此外，檢測來自某縣市食品業用未滅菌瓶裝蛋液(每瓶約 1kg，每瓶取樣之整鍋蛋液約混合 1000-2000 顆蛋)的沙門氏菌帶菌率及血清型(表八)，發現 24 瓶中未滅菌蛋清、未滅菌蛋黃和未滅菌全蛋液共 8 瓶帶菌，其帶菌率分別是未滅菌蛋白液 33.3%(3 瓶/9 瓶)、未滅菌蛋黃液 22.2%(2 瓶/9 瓶)和未滅菌全蛋液 50.0%(3 瓶/6 瓶)，其中主要的血清型為 Enteritidis (37.5%，3/8)，其次為 Infantis (25.0%，2/8)。本計畫 106-108 年度採樣之結果顯示，完整的蛋共 276 顆連殼混測沙門氏菌檢出率為零(含洗選及未洗選蛋)，可見台灣目前單顆蛋沙門氏

菌帶菌率應很低，但未滅菌之蛋液帶菌率則都在 20%以上，可能因為多顆蛋混合造成沙門氏菌污染被放大，如使用未滅菌混合蛋液之食品業者在後端處理上未確實低溫保存，可能造成生菌數及沙門氏菌菌量再被放大，如未完全煮熟則大幅增加食用之感染可能，這點值得政府相關單位重視。

106-108 年度(即西元 2017-2019)年傳統市場、超級市場生豬肉及雞肉檢出率比較

比較西元 2017-2019 年傳統市場、超級市場生豬肉(圖六 A)及生雞肉(圖六 B)的帶菌率，顯示(1)生豬肉比生雞肉有較高的帶菌率；(2)比較來自傳統市場相對於超級市場的食材沙門氏菌帶菌率，明顯較高。

豬肉生產線沙門氏菌帶菌的採檢分析：由於我們已從臨床病人端和市場食材端找到許多相同血清型沙門氏菌菌株，及在市場生豬肉有高度的沙門氏菌帶菌率(圖六 A)。因此，我們選擇豬肉生產線做為更一步追蹤和檢測的目標，從上游豬肉屠體處理、分切、運送和到達市場販售端，是否沙門氏菌的帶菌率會有如金字塔型一路被放大的效應發生(圖七)。因此，本研究選擇兩處豬肉生產線，分別是冷鏈及傳統市場生產線，檢測豬肉市場生產線上兩者各節點的沙門氏菌帶菌率，如下是依序檢測的結果：

- i. **模擬採檢靈敏度之測試：**因環境及屠體表面採樣之檢驗方法(採檢及培養流程參考 USDA Laboratory Guidebook，如方法學所述)不同於 TFDA 肉品檢驗沙門氏菌之流程，為求實驗之嚴謹，我們進行了模擬採檢之屠體/器具表面採樣之靈敏度測試，整體模擬及檢驗流程如圖八。經過二重複測試(Tests 1 & 2)，結果顯示本實驗室以 USDA 之檢驗方法(圖九)，所檢測的靈敏度最佳為 1.4×10^1 CFU/100 cm² 可檢出沙門氏菌(表九)。
- ii. **北台灣冷鏈豬肉品公司生產線沙門氏菌帶菌的採檢分析：**根據配合之北台灣 CAS 認證全程冷鍊之肉品公司所提供的生產線流程圖(圖十)，我們從豬隻屠宰後到肉品在店面販售一共規劃了 20 個採檢點。因該公司之豬肉生產線從屠宰、預冷、分切到進入市場時間共需 3 天，故分成三個時間點採樣，但皆為同一批屠宰之豬隻及肉品，包括在 2019/5/8

日採檢該公司下游三間不同之店面。結果顯示，此冷鏈公司生產流程其沙門氏菌的帶菌僅在店面刀具(14.3%，1/7；血清型皆為 Schwarzengrund)及店面的生豬肉肉品(6.7%，1/15；血清型皆為 Typhimurium)中測到(表十)；然而此肉品運送車子的環境端儘管都沒有與肉品直接接觸，但環境檢測帶菌率偏高，即車子的地板(80.0%，4/5；血清型皆為 Derby)和籃子內部(20.0%，2/5；血清型分別為 Derby 和 Typhimurium) (表十)，此結果可能會讓肉品汙染的風險增加。所幸因為該公司工作人員之手部之手套為拋棄式、刀具及砧板每 2 個小時更換或消毒，而且肉品處理及運送全程皆於低溫(4-15°C)中操作，和使用一次性袋子包住肉品，以阻絕籃子、手部、及地板等可能造成肉品交叉汙染之可能來源，以及降低沙門氏菌增生的機會，因此僅在小分切砧板上測到一次(4.8%，1/21；血清型為 *S. Newport*) (表十)。此結果顯示，欲降低沙門氏菌的跨物種的感染，最重要是要避免運送過程中發生交叉汙染。因此，除了應包裝肉品以避免與外界交叉汙染，和低溫冷藏以降低沙門氏菌增生之外，還要注意處理肉品的刀具可能發生交叉汙染的問題。

- iii. **傳統鏈市場生產線沙門氏菌帶菌之採檢分析：**我們選擇在某縣市傳統鏈豬肉市場生產線上採檢沙門氏菌之帶菌率(表十一)，檢測結果顯示剛屠宰完之豬隻屠體僅在表面(15.0%，3/20；血清型分別為 Derby、Livingstone 和 Weltevreden)被測出沙門氏菌，但屠體內側則為零檢出率。在分切室地板(20.0%，2/10；血清型分別為 Agona 和 Livingstone)及人員手部(10.0%，1/10；血清型為 Agona)也有被檢測出帶菌。在運輸車地板上的沙門氏菌汙染率也很高(60.0%，9/15；血清型分別為 Agona、Amsterdam var. 15+ (1)、Anatum、Derby、Kedougou、Livingstone、Newport 和 Typhimurium)。在店面處理肉之前的砧板上有沙門氏菌汙染(25.0%，1/5；血清型為 Derby)，在店面第一次切肉後的砧板(25.0%，1/4；血清型分別為 Weltevreden)和人員手部(25.0%，1/4；但含有兩種血清型分別為 Derby 和 Livingstone)上也同時都有測出沙門氏菌汙染。值得注意的是在店面快收攤的時候所測出的沙門氏菌帶菌，相對於此肉品處理的前期，則有偏高的趨勢。結果顯示在肉品販售的後期沙門氏菌已被大量增生而放大其汙染率，如刀具(83.3%，5/6；血清型分別為 Agona、Anatum、Derby、Livingstone 和 London)、砧板(100%，6/6；血清型分別為 Agona、Anatum、Derby、Livingstone、

London 和 Senftenberg)、人員手部(66.7%，4/6；血清型分別為 Agona、Anatum、Derby、Livingstone 和 London)、絞肉機(66.7%，2/3；血清型都為 Livingstone)和生豬肉肉品(20.0%，3/15；血清型分別為 Anatum、Derby 和 Senftenberg)(表十一)。此結果顯示，生豬肉在處理過程中及運送過程中可能發生交叉汙染，並放大汙染率發生的重要原因(圖七)。

iv. 冷鏈及傳統鏈豬肉市場生產線各節點檢出率比較：比較冷鏈及傳統鏈豬肉市場生產線各節點上的沙門氏菌的檢出率，結果顯示冷鏈處理的檢出率大致都比傳統(無冷鏈)處理的明顯偏低，尤其是在分切室環境($P=0.002^{**}$)，和店面環境($P=0.001^{**}$)最為顯著(表十二)。但除了運送車環境端因為在冷鏈處理的肉品都有塑膠袋包覆，以致忽略了外在環境清潔的必要性，所以檢出率反而比傳統鏈的高。

市場採樣菌株之抗藥性：在 106-108 年度計畫中，我們在市場所採集的沙門氏菌共 117 沙門氏菌株和鑑定 23 種血清型(圖十一)。以及在 108 年度，我們共在生產線分離出 57 菌株，其中有 12 種血清型被鑑定(圖十二)。分析 106-108 年度市場採樣沙門氏菌株的抗藥性，發現對 ceftriaxone 有高抗藥性的血清型有 Goldcoast (100%，2/2)和 Anatum (68.8%，11/16) 兩型，和對 ciprofloxacin 有高抗藥性的血清型有 London (50.0%，4/8)、Livingstone (20.0%，1/5)、Kentucky (44.4%，4/9)、Goldcoast (68.8%，11/16)、Give (100%，5/5)、Enteritidis (25.0%，1/14)、Derby (42.1%，8/19)、Brancaster (100%，3/3)、Anatum (75.0%，12/16)和 Albany (77.8%，7/9)十型。分析 108 年度生產線採樣沙門氏菌株的抗藥性，發現對 ceftriaxone 有高抗藥性的血清型有 Anatum (100%，6/6)和 Agona (16.7%，1/1) 兩型，和對 ciprofloxacin 有高抗藥性的血清型有 Schwarzengrund (100%，1/1)、Livingstone (45.5%，5/11)、Derby (68.4%，13/19)、和 Agona (16.7%，1/1)五型。因此，這些高抗藥性的血清型沙門氏菌菌株應該特別被重視並持續被追蹤和監測，以降低當沙門氏菌對人類及家畜動物健康造成威脅時，不會面臨無藥可用的窘境。

市場採樣與臨床病人分離之沙門氏菌菌株親緣性 NGS 分析: 我們進一步利用 NGS 定序分析分別來自 106-108 年度 76 株沙門氏菌 Anatum 菌株(包含市場食材分離之 16 株、豬肉生產線採檢的 6 株，以及來自臨床病人分離之 54 株) (圖十三)和 33 株 Goldcoast 菌株(包含 2 株市場採檢菌株及 31 株病人分離菌株) (圖十四)之全基因組序列之親緣性關聯性。這 76 株 Anatum 菌株可以被劃分為三大族群(Cluster 1、Cluster 2 和 Cluster 3)，其中以 Cluster 1 族群遺傳變異的中位數 SNP 距離(median single-nucleotide polymorphism distance)和平均值(mean SNP distance)最小，則代表其遺傳的相似度和親緣度最高，而且由於它們的來源包含了來自市場食材、豬肉生產線檢體和臨床病人的分離菌株。另外，這 33 株 Goldcoast 菌株也可以被劃分為三大族群(Cluster 1、Cluster 2 和 Cluster 3)，其中以 Cluster 1 和 Cluster 2 族群遺傳變異的中位數 SNP 距離(median single-nucleotide polymorphism distance)和平均值(mean SNP distance)最小，相似度和親緣度最高，而且在 Cluster 2 中的菌株來源包含了來自市場食材和臨床病人的分離菌株。

五、總結

在 108 年度中，我們例行性完成第三年 1-9 月的林口長庚醫院 565 位沙門氏菌感染病患臨床資料，並依據其年齡之差別(以<5 歲和>65 歲為主要來源)，探討其與臨床沙門氏菌檢體來源(以腹瀉糞便為主要來源)及血清分群(除了以 D 型和 B 型為主之外，C2 有越來越多的趨勢)之相關聯性。同時在未滿一歲感染沙門氏菌 Case-Control Study 之風險評估上，其結果指向照顧場所購買雞蛋為散裝未經洗選之零售蛋、照顧場所處理生雞肉/豬肉/雞蛋會清洗、照顧者餵食小朋友前曾處理肉類(雞肉/豬肉)食材、和照顧場所購買生豬肉的主要來源為傳統市場等因素具有較高強度的感染風險評估值。從食材來源也顯示來自傳統市場比超級市場有著較高的沙門氏菌帶菌率，並且生豬肉比生雞肉的帶菌率高。

因為生豬肉和生雞肉的沙門氏菌帶菌率是所有檢測食材中最高的，然而肉品在畜產養殖場到屠宰時的帶菌率卻都不高。為了追蹤肉品從屠宰到販售端的沙門氏菌帶菌率是在哪一關鍵節點上造成汙染或細菌增生的，所以我們進一步設計豬肉生產線上的沙門氏菌汙染率的檢測流程，即從屠體分切、運送，直到販售等各個節點的採檢分析，以釐清所有流程中生豬肉是如何增加或放大沙門氏菌帶菌率。同時比較傳統生產線和有冷鏈預冷處理的生豬肉帶菌的差異。首先我們確認了本實驗室檢測沙門氏菌活菌的正確性和靈敏性，在依據 USDA 之檢驗

方法所檢測的最佳靈敏度可以達到 1.4×10^1 CFU/100 cm² 的可檢出率。據此基礎我們證實了生豬肉處理的流程中沙門氏菌的帶菌率有被放大的現象，並且有冷鏈的處理則明顯少於傳統鏈流程下肉品的帶菌(或汙染)率。由此可知肉品處理過程會隨著時間延長以及與外在環境接觸的增加而遭受更多汙染，除非以全程低溫(4-15°C) 肉品處理，加上增設與外在環境隔絕的包裝(如塑膠袋)，來避免交叉汙染的發生。尤其在傳統市場夏秋兩季氣溫較高之下，到了當天販售結束前，因處理過肉品的工具(如刀具、砧板、絞肉機)，經過長時間的沙門氏菌增生，以致讓工具及肉品本身的沙門氏菌帶菌率均明顯增加(表十一)；而且操作人員手部的帶菌率也隨著營業時間的延長而明顯增加了(從 0%增至 66.7%)。另一方面，生豬肉處理時的環境也應注意，除了砧板、人員手部、刀具、絞肉機等的汙染率要留意之外，運送時的地板和籃子也容易被忽略。例如，我們發現即使在冷鏈處理下，運送時的地板和籃子內側雖然沒有與生豬肉直接接觸，但其高達 40-80%的帶菌率，顯然清潔層面上可能不徹底或被忽略，而潛在具有間接汙染生豬肉的機會。這些因素都是主要造成交叉汙染和放大細菌增生機會的原因。因此，為了要減少沙門氏菌的汙染，建議所有肉品的處理流程，從屠體分切到市場販售端，皆應保持低溫，以及與肉品接觸的用具皆應經常清潔，以避免細菌的孳生，因而造成交叉汙染及放大汙染的發生。

除了檢測北台灣(台北市、新北市和桃園市)主要熱點市場的沙門氏菌帶菌率之外，作為某縣市傳統市場生產線之採樣背景調查，我們亦在 108 年度也採樣了在台灣某縣市之傳統市場和超級市場食材(N=133)。其結果亦指出傳統市場的帶菌率最高，生豬肉 37.8% (14/37)，生雞肉 22.2% (2/9)，生牛肉 50% (1/2)，且首次在生牛肉分離出沙門氏菌菌株 *S. Anatum*。然而我們在 106-108 年度共檢測 46 份市場雞蛋檢體(包含散裝蛋及未洗選蛋，每份 6 顆連殼混測，共 276 顆)，檢出率均為零；但我們在 108 年度檢測來自某縣市的 24 份食品業用瓶裝蛋液(單瓶約 1kg，整體混裝流程共約使用 1000-2000 顆蛋)，蛋白液檢出率 33.3% (3 瓶/9 瓶)，蛋黃液檢出率 22.2% (2 瓶/9 瓶)，全蛋液檢出率 50% (3 瓶/6 瓶)，顯示目前台灣單顆蛋的沙門氏菌汙染率其實不高。雖然單顆蛋汙染率極低，若在混裝流程中如果混入受汙染沙門氏菌之雞蛋，或被處理之環境器具和操作人員之手部汙染，經過長時間的運送和儲存，都可能增加沙門氏菌交叉汙染和放大汙染的可能性，再者，若後端食品業者未注意瓶裝蛋液儲存之溫度或烹煮料理未全熟則可能大幅增加食用者感染沙門氏菌之風險，值得政府相關單位正視。

為避免沙門氏菌感染發生，初步建議改善民眾烹煮及飲食習慣，並注意以下阻斷沙門氏菌傳染途徑的有效措施（根據 Silva & Gibbs. Food Research International. 2012; 45: 695）：

- i. 因為問卷內容以“照顧場所處理生雞肉、豬肉、雞蛋會清洗”和“照顧者餵食小朋友前曾處理其他肉類(雞肉/豬肉)食材”風險值較高，且大部分飲食習慣為從傳統市場購入肉類進入家裡自煮，有可能嬰幼兒之感染是來自於料理習慣不良及環境汙染所造成。
- ii. 嬰幼兒是主要感染對象，由於他們大部分都還在喝奶粉、米精，大部分廠牌之奶粉及米精都有附勺匙，如餵食者泡奶粉時手部並未消毒完全，很有機會將沙門氏菌帶入粉末中。台灣氣候潮濕(相對溼度經常>60%，因此，有利於微生物的生長)，勺匙連把手部分都未入粉末中有可能繁殖沙門氏菌；又因泡奶粉時大部份的家長幾乎都使用 42 度左右之溫開水(奶瓶恆溫器一般設定之溫度)簡單泡開即餵嬰幼兒食用，如果奶粉中已遭受沙門氏菌汙染，此溫度及浸泡時間均不足以達到殺菌之效果，嬰幼兒免疫力又相較於大人低，所以攝入低菌數的沙門氏菌，則可能也會造成感染。因此基於此理由欲阻斷沙門氏菌可能造成疾病發生，建議可由下列方法：

- (1) 奶粉勺匙應保持乾燥、乾淨。
- (2) 奶粉勺匙不應置於奶粉罐中，應另外存放，並常清洗和乾燥處理。
- (3) 奶粉、米精等應保存於乾燥之環境中，並於開封後一個月內食用完畢，如仍未食用完應丟棄避免孳生細菌。
- (4) 泡奶粉時的溫度應該至少達 65.6°C 以上，才有降低 1 個 log 以上的沙門氏菌數。
- (5) 避免生熟食之砧板共用，以致造成沙門氏菌交叉汙染。由於難免在豬肉、雞肉生肉中含有沙門氏菌，因此生熟食應個別使用特定的砧板。

在分子檢測沙門氏菌上，我們已利用 WGS 檢測分別來自市場食材、豬肉生產鏈的檢體和臨床檢體所分離之高度抗藥性重點沙門氏菌菌株(*S. Anatum* 76 株及 *S. Goldcoast* 33 株)，這些血清型菌株大部份對 ceftriaxone 或 ciprofloxacin 具抗藥性，根據我們的研究，這兩種高度抗藥血清型主要分離來自生豬肉及生雞肉，其中一株 *Anatum* 則來自於生牛肉。我們更進一步分析血清型 *Anatum* 和 *Goldcoast* 的 WGS 和遺傳親緣性圖譜，證實此兩種血清型在市場生肉品、豬肉生產鏈和臨床病人所分離的沙門氏菌菌株間有很高的親緣性(<20 SNPs)。

本三年計畫檢測系統的建立，已能初步繪製沙門氏菌在人類和食物之間跨物種傳染的關聯性，包括地理分佈、風險圖像與細菌遺傳親緣圖譜，以及分析從農場到餐桌(from Farm to Table)可能造成沙門氏菌污染的關鍵點。此成果希望將來能有助於政府相關單位提出防治策略和實地監測等公共政策的制定，以阻斷可能跨物種傳染的發生，進而降低人類透過食物途徑感染沙門氏菌的機會。

六、 致謝

感謝台中 CDC 邱乾順教授幫忙 PFGE 之分析。

七、 參考資料

- 1 Bottichio L, Medus C, Sorenson A, et al. Outbreak of *Salmonella* Oslo Infections Linked to Persian Cucumbers - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65:1430-1433.
- 2 Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, McFarland MA, Brown EW. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol.* 2016;9(3):279-92.
- 3 Bottichio L, Medus C, Sorenson A, Donovan D, Sharma R, Dowell N, Williams I, Wellman A, Jackson A, Tolar B, Griswold T, Basler C. Outbreak of *Salmonella* Oslo Infections Linked to Persian Cucumbers - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(5051):1430-1433.
- 4 Chiou CS, Torpdahl M, Liao YS, Liao CH, Tsao CS, Liang SY, Wang YW, Kuo JC, Liu YY. Usefulness of pulsed-field gel electrophoresis profiles for the determination of *Salmonella* serovars. *Int J Food Microbiol.* 2015;214:1-3.
- 5 Chiu LH, Chiu CH, Horn YM, Chiou CS, Lee CY, Yeh CM, Yu CY, Wu CP, Chang CC, Chu C. Characterization of 13 multi-drug resistant *Salmonella* serovars from different broiler chickens associated with those of human isolates. *BMC Microbiol.* 2010;10:86.
- 6 Chu C, Wong DW, Wang MH, Lin HH, Chen YS, Tien N, Shih MC, Chen TH, Chiu CH. Genotyping, plasmid analysis, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans and chickens in central Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2009;108(10):765-71.
- 7 Chen CL, Su LH, Janapatla RP, Lin CY, Chiu CH. Genetic analysis of virulence and antimicrobial-resistant plasmid pOU7519 in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *J Microbiol Immunol Infect* 2017. (accepted). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.11.004>.

- 8 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 24th informational supplement. M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 9 Deak E, Hindler JA, Skov R, Sjölund-Karlsson M, Sokovic A, Humphries RM. Performance of Etest and disk diffusion for detection of ciprofloxacin and levofloxacin resistance in *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(1):298-301.
- 10 Barbau-Piednoir E, Bertrand S, Mahillon J, Roosens NH, Botteldoorn N. SYBR®Green qPCR *Salmonella* detection system allowing discrimination at the genus, species and subspecies levels. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:9811.
- 11 Gambino-Shirley K, Stevenson L, Concepción-Acevedo J, et al. Flea market finds and global exports: Four multistate outbreaks of human *Salmonella* infections linked to small turtles, United States-2015. *Zoonoses Public Health*. 2018 Mar 25. doi: 10.1111/zph.12466.
- 12 Gautam D, Dobhal S, Payton ME, Fletcher J, Ma LM. Surface survival and internalization of *Salmonella* through natural cracks on developing cantaloupe fruits, alone or in the presence of the melon wilt pathogen *Erwinia tracheiphila*. *PLoS One*. 2014;9:e105248.
- 13 Hassan R, Rounds J, Sorenson A, Leos G, Concepción-Acevedo J, Griswold T, Tesfai A, Blessington T, Hardy C, Basler C. Multistate Outbreak of *Salmonella* Anatum Infections Linked to Imported Hot Peppers - United States, May-July 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66(25):663-667.
- 14 Lee YI, Lin TY, Hsu SW, Huang LC, Huang WT, Liao YS, Chiou CS. *Salmonella* Enteritidis outbreak linked to a bakery in Kinmen, Taiwan, November 2016. *Taiwan Epidemiol Bullet*. 2018;34:147-152.
- 15 Jiang Y, Sokorai K, Pyrgiotakis G, Demokritou P, Li X, Mukhopadhyay S, Jin T, Fan X. Cold plasma-activated hydrogen peroxide aerosol inactivates *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria innocua* and maintains quality of grape tomato, spinach and cantaloupe. *Int J Food Microbiol*. 2017;249:53-60.
- 16 Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautam R, Boyle DS. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(10):3608-15.
- 17 Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Evaluation of culture media for selective enrichment and isolation of *Salmonella* in seafood. *JAOAC Int*. 2010;93(5):1468-71.
- 18 Lee HY, Su LH, Tsai MH, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Park KH, Perera J, Carlos C, Tan BH, Kumarasinghe G, So T, Chongthaleong A, Hsueh PR, Liu JW, Song JH, Chiu CH. High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2696-9.
- 19 Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(12):7046-52.
- 20 Marshall KEH, Tewell M, Teclé S, et al. Protracted Outbreak of *Salmonella* Newport Infections


- Linked to Ground Beef: Possible Role of Dairy Cows - 21 States, 2016-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67:443-446.
- 21 Mermin J, Hoar B, Angulo FJ. Iguanas and *Salmonella marina* infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics.* 1997;99(3):399-402.
 - 22 Monfort S, Gayán E, Condón S, Raso J, Alvarez I. Design of a combined process for the inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg at 55°C. *Int J Food Microbiol.* 2011;145(2-3):476-82.
 - 23 Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. Enterobacteriaceae. *Vet Microbiol Microb Dis.* 2002; 106-123.
 - 24 Sato Y, Mori T, Koyama T, Nagase H. *Salmonella* virchow infection in an infant transmitted by household dogs. *J Vet Med Sci.* 2000 Jul;62(7):767-9.
 - 25 Silva FVM, Gibbs PA. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International.* 2012; 45: 695–699
 - 26 Stephen J, Edward C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult, 7th Edition.* 2010.
 - 27 Su LH, Teng WS, Chen CL, Lee HY, Li HC, Wu TL, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in salmonellae, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1086-1090.
 - 28 Su LH, Wu TL, Chiu CH. Decline of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis infections, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:715-6.
 - 29 Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):382-9.
 - 30 Wachs D. Superbug's Found on Nearly 80% of Our Grocery Meat. 2018 June. <https://doctordaliah.wordpress.com/2018/06/29/superbugs-found-on-nearly-80-of-our-grocery-meat/>. Available on Nov. 15, 2018.
 - 31 Yu CY, Chou SJ, Yeh CM, Chao MR, Huang KC, Chang YF, Chiou CS, Weill FX, Chiu CH, Chu CH, Chu C. Prevalence and characterization of multidrug-resistant (type ACSSuT) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains in isolates from four gosling farms and a hatchery farm. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):522-6.
 - 32 Zheng Q, Mikš-Krajnik M, D'Souza C, Yang Y, Heo DJ, Kim SK, Lee SC, Yuk HG. Growth of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* cells on mung bean sprouts in different commercial enrichment broths. *Food Microbiol.* 2015;52:159-68.
 - 33 邱乾順。 *Salmonella* 與 *Listeria* 食媒性病原之 分子分型監測與流行病學分析。台灣衛生福利部疾病管制署 102 年委託科技研究計畫研究報告。
 - 34 周倩玉、陳珮甄、吳修儀、蔡玉芳、董曉萍、顏哲傑。2015 年 4 月至 2016 年 4 月臺北區六縣市腹瀉群聚流行病學分析報告。 *疫情報導*: 2017; 33: 31-37。

- 35 蔡宇馨；2009 年中部地區產蛋雞與帶殼蛋之沙門氏菌監測調查；
<http://hdl.handle.net/11455/66347>。
- 36 食品微生物之檢驗方法－沙門氏桿菌之檢驗。102 年 12 月 23 日部授食字第 1021951187 號公告修正。。
- 37 邱乾順、廖盈淑、廖春杏等：國內沙門氏菌感染症監測與流行現況。疫情報導 2015；31(10)：235-43。
- 38 蔡宜臻、陳婉青、廖盈淑、邱乾順、陳珮甄、簡玉潔、郭宏偉：2014 年新北市淡水區沙門氏菌群聚感染溯源調查。疫情報導 2015；34：153-158。
- 39 徐本立。台灣地區不同規模肉雞電宰場之屠體衛生品質調查。碩士論文。國立中興大學畜產學系。2001 年 6 月。
- 40 鄭智翔。種禽蛋消毒與孵化率提升技術及運送箱品質之研究。行政院農業委員會畜產試驗所 103 年度科技計畫研究報告。103 農科-2.1.5-畜-L1(2)。
- 41 李薇薇、白莉、張秀麗等人。中國四省份規模化肉雞生產全過程沙門菌的污染狀況和耐藥特徵研究。中華預防醫學雜誌 2018; 52: 352-357。

八、預定進度及 Milestone

每月/季執行之目標 (milestone)

108 年	預定執行事項
第一季 (1~3 月)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 繼續完成 107 全年度之臨床統計 2. 統計分析 108 年 1~2 月臨床資料 3. 進行未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷收案 4. 參訪欲採樣之豬肉生產線流程
第二季 (4~6 月)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 統計分析 108 年 1~5 月臨床資料 <ol style="list-style-type: none"> (1) 臨床菌株的收集 (2) 臨床菌株之血清分群或血清分型 2. 進行未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷收案 3. 延續第二年計畫沙門氏重點菌株之 WGS 序列分析 4. 豬肉生產線節點之採樣、培養、鑑定 5. 中報告及口頭報告
第三季 (7~9 月)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 分析 108 年 1~8 月臨床資料 <ol style="list-style-type: none"> (1) 臨床菌株的收集 (2) 臨床菌株之血清分群或血清分型 2. 滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷收案 3. 滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷 4. 豬肉生產線節點之採樣、培養、鑑定 5. 豬肉生產線節點分離菌株之血清型(Serotype)鑑定及抗藥性分析
第四季 (10~12 月)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 分析 108 年 1~9 月臨床資料 2. 分析未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷 3. 評估豬肉生產線各節點之汙染率及抗藥性 4. 探討病患感染之沙門氏菌菌株與市場採樣陽性菌株基因序列之親源性 5. 繳交期末報告及口頭報告

計畫主持人簽名： 

日期： 108 年 11 月 13 日

九、108 年度期中報告繳交前應完成工作項目表

計畫編號：MOHW108-CDC-C-114-133505

計畫名稱：沙門氏菌之跨物種間感染、監測與管理機制之研究

計畫主持人：陳奇良

執行機構：長庚醫療財團法人林口長庚紀念醫院

依計畫書內容 108 年度期中報告繳交前應完成工作項目：

項次	項目	完成時間
1	繼續完成 107 全年度之臨床統計	第一季 (1~3 月)
2	A.參訪欲採樣之豬肉生產線流程 B.規劃豬肉生產線之採樣節點	第一季 (1~3 月)
3	統計分析 108 年度 1~5 月臨床資料 <ul style="list-style-type: none"> ■ 臨床菌株的收集 ■ 臨床菌株之血清分群或血清分型 	第二季 (4~6 月)
4	進行未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷收案	第二季 (4~6 月)
5	分析未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷	第二季 (4~6 月)
6	延續第二年計畫沙門氏重點菌株之 WGS 序列分析	第二季 (4~6 月)

計畫主持人簽名：



日期：108 年 11 月 13 日

十、108 年度全程應完成工作項目表


計畫編號：MOHW108-CDC-C-114-133505

計畫名稱：沙門氏菌之跨物種間感染、監測與管理機制之研究

計畫主持人：陳奇良

執行機構：長庚醫療財團法人林口長庚紀念醫院依計畫書內容

項次	項目	完成時間
1	繼續完成 107 全年度之臨床統計	第一季 (1~3 月)
2	繳交期中報告及期中口頭報告	第二季 (4~6 月)
3	進行豬肉生產線節點之採樣、培養、鑑定	第三季 (7~9 月)
4	進行豬肉生產線節點分離菌株之血清型 (Serotype)鑑定及抗藥性分析	第四季 (10~12 月)
5	評估豬肉生產線各節點之汙染率差異	第四季 (10~12 月)
6	統計分析 108 年 1~9 月臨床資料	第四季 (10~12 月)
7	分析未滿一歲之嬰幼兒 Case-Control Study 問卷	第四季 (10~12 月)
8	延續第二年計畫沙門氏重點菌株之 WGS 序列分析	第四季 (10~12 月)
9	探討病患感染之沙門氏菌菌株與市場採樣陽性菌株 基因序列之親源性	第四季 (10~12 月)
10	繳交期末報告及口頭報告	第四季 (10~12 月)

計畫主持人簽名： 

日期：108 年 11 月 13 日

附表、附圖