

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-112520

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

計畫名稱：李斯特菌症監測防治—建立實驗室檢驗與菌株分析量能

108 年 度 研 究 成 果 報 告

執行機關：疾病管制署(檢驗及疫苗研製中心)

計畫主持人：邱乾順 聘任研究員

研究人員：廖盈淑、張瑞顯、洪羽屏、劉儼毅

執行期間：108 年 8 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目錄

	頁	碼
目錄	1	
計畫中文摘要	2	
計畫英文摘要	3	
計畫內容		
一、前言	5	
二、材料與方法	8	
三、結果	9	
四、討論	10	
五、結論與建議	10	
六、計畫重要研究成果及具體建議	11	
七、參考文獻	12	
八、圖、表	15	
九、附件	18	
期末審查意見回復	25	
政府研究計畫(期末報告)摘要資料表(GRB)		

計 25 頁

摘要

2018年1月李斯特菌症正式列入我國法定傳染病，以強化疾病之監測與防治；2018年全年總計有168例確定病例(25%死亡)，發生率為0.72例/每10萬人；高於美國的發生率(0.26例/每10萬人)與死亡率(15.9%)，急需強化疾病之監測與防治。2019年1月16日疾病管制署(本署)召開跨機關之「李斯特菌監測防治會議」，規劃本署研檢中心負責1)採檢人員環境檢體採檢之教育訓練，2)環境檢體檢驗工作，3)建立跨機關菌株比對機制。本計畫依據此李斯特菌防疫上之急迫需求，分兩年1)建立環境檢體採檢、檢驗流程與序列分析方法之標準操作流程，供後續進行檢驗環境檢體與菌株之基因指紋比對；2)建立跨機關李斯特菌病原體資料分析機制，提供不同機關能相互比對菌株基因指紋、評估菌株間親緣關係、追溯菌株來源(strain tracking)；3)建立跨機關共同李斯特菌全基因資料庫：集中跨機關菌株資料，包括基因指紋(cgMLST profiles)、人口學與流行病學資料，讓跨機關有關人員方便取得李斯特菌病原菌株之相關資料，使跨機關資料能共有共享，提升資料應用價值；4)檢驗2019—2020年針對病例追蹤所採檢之檢體。

關鍵詞：

人畜共通病原、食媒性病原、次世代定序、全基因體定序

Abstract

Listeriosis has been announced to be a notifiable disease in Taiwan since January 2018 for strengthening the surveillance and control of the disease. In 2018, a total of 168 confirmed cases of listeriosis was reported to Taiwan Centers for Disease Control (Taiwan CDC), Ministry of Health and Welfare, with an incidence rate of 0.72 cases/100,000 people and a 25% case-fatality rate. The incidence and case-fatality rate are higher in Taiwan than in the USA, for which the incidence and mortality are 0.26 cases/100,000 people and 15.9%, respectively. The listeriosis surveillance results urge relevant government authorities to discuss the strengthening of surveillance and control measures. On January 16, 2019, a joint meeting was called by Taiwan CDC, the Food and Drug Administration, and Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine to discuss the plan for the surveillance and control of listeriosis. The Center for Research, Diagnostics and Vaccine Development of Taiwan CDC was designated with the responsibility for 1) training of health inspectors on the sampling of environmental specimens, 2) microbiological testing of environmental specimens, 3) developing a technical platform for comparison of *Listeria monocytogenes* isolates from the 3 agencies (TCDC, TFDA, BAPHIQ). To accomplish the assignments, we will aim 1) to establish the standard operation procedures for sampling of environmental specimens, *Listeria*-related testing, whole genome sequence bioinformatic analysis, 2) to build up a cross-laboratory data analysis mechanism for generating and comparing genetic fingerprints of the *Listeria monocytogenes* isolates and further for the global strain tracking; 3) to establish a common *L. monocytogenes* genetic fingerprint database, which contains strain genetic profiles, demographic data, and epidemiological data of domestic isolates, to allow staff of the 3 agencies easily to acquire the information of the pathogenic *L. monocytogenes* strains; 4) to examine the environmental specimens collected from 2019—2020 listeriosis patients'

refrigerators. This project will establish the laboratory capability and technical platform for collaborators in the surveillance and control of listeriosis.

keywords :

Listeria monocytogenes, Listeriosis, Zoonotic pathogen, Foodborne pathogen, Next-generation sequencing (NGS), Whole genome sequencing (WGS), Web-based service

一、前言：

李斯特菌症(listeriosis)是人畜共通傳染病，造成動物與人類輕微腸胃炎或嚴重侵襲性感染，引發菌血症、腦炎、腦膜炎、孕婦流產或死胎等，孕婦、高齡者與免疫功能低下的人是李斯特菌症的高危險族群(1)。*Listeria monocytogenes* 是李斯特菌症的病原菌，廣泛被分離自人、動植物、環境(如土壤、溪流)與食物(如牛奶、乳酪、生肉、海鮮、生菜)，生長溫度範圍為-1°C—45°C (2, 3)，即在冰箱冷藏的低溫環境仍能生長。李斯特菌症主要經由被病原體污染的食物傳播，潛伏期長(4-6)，發病率低(7)，大多以”散發性”病例的面貌出現，回溯追查病例間之流病關聯性與感染來源相當困難，然而國際間仍不時爆發大規模李斯特菌食品中毒案，例如 2011 年美國跨 28 州的哈密瓜李斯特菌中毒案，至 2012 年 8 月 27 日確認 147 病例，33 例死亡(8)；2017—2018 年(2017-1-1 至 2018-7-17)南非李斯特菌食品中毒案，有 1,060 病例，216 人死亡(9)；2018 年澳洲哈密瓜李斯特菌中毒案，有 19 確定病例，7 人死亡與 1 例流產(10)。

台灣至今尚未有確認的李斯特菌食品中毒案件，2018 年前也未有官方的病例統計，然而學術界研究調查指出，我國李斯特菌症患者有 26%—29% 的死亡率(11-14)，衛福部疾病管制署(疾管署)建置之實驗室傳染病自動通報系統所收集之 109 例病例(2014 年 7 月至 2016 年 6 月)，有 21 人(19%)於 30 日內死亡(15)，然而此階段之資料不完整，無法計算李斯特菌症之年發生率。基於李斯特菌之高死亡率與估計國內每年至少有 100 例病例，因此公告將李斯特菌症自 2018 年 1 月 1 日開始列入第四類法定傳染病，以強化此疾病之監測與防治。李斯特菌症因列入法定傳染病，全國各醫療院所有義務通報李斯特菌病例與送交菌株至疾病管制署進行分析。2018 年全國通報實驗室確認的總數有 168 例病例，發生率為 0.72 例/100,000 人，在疾管署預防醫學辦公室完成流病調查之 103 病例中，有 26 例(25%)死亡；對照美國每年約有 800 例實驗室確認病例，發生率為 0.26 例/100,000 人，死亡率為 15.9 (16)，台灣的李斯特菌症發生率與死亡率皆高於美國。

台灣李斯特菌症高發生率與高死亡率，需相關機關強化疾病之監測與防治。2019年1月16日疾管署邀請食品藥物管理署(食藥署)與農委會動植物防疫檢疫局(農委會防檢局)，召開跨機關之「李斯特菌監測防治會議」，協商上中下游機關在疾病監測防治之分工與工作重點，其中規劃疾管署研檢中心負責之工作包括：1)採檢人員教育訓練，2)環境追蹤檢體檢驗，3)建立跨機關菌株比對機制。

李斯特菌普遍存在動植物與環境中，生鮮食品普遍受到污染(17)，感染潛伏期長達3—70天(4, 6)，發病率極低(7)，加上病例皆以”散發病例”方式出現，因此不易透過時空群聚資料，比對病例間之流病關聯性，追查到感染來源。國際上的普遍作法即調查病例之冰箱環境與食餘食品，分離菌株並比對人、環境與食品菌株基因型別，藉此追查可能的感染與污染食品來源(18)。

病原體的分離培養檢驗是流病溯源調查最基本的工作，檢體取樣之器材、取樣方法、檢體運送與實驗室檢驗方法，都會影響病原體之分離率；許多研究在病原體分離陽性率顯現很大差異，很可能是採樣與檢驗方法差異的結果(19, 20)。因此，本計畫必需先評估採檢器材、採檢方式、環境檢體病原體分離培養方法，訂定標準操作流程，且進行採檢人員的教育訓練。在菌株的比對上，需訂定機關間共同的基因分型方法與比對的標準操作程序，建立共同基因資料庫，讓參與的機關實驗室能輕易比對菌株遺傳關聯，和能即時取得菌株來源之人口學與流病學資料。

本研究第一年(2019年)將先進行1)環境檢體採檢方法之評估、標準方法之建立。將蒐尋學者發表之論文，比較病原體分離率高的研究所使用的採檢器材、採樣方法，進行實際之操作與評估，建立標準操作流程；2)評估現有之環境檢體檢驗方法之靈敏度，建立標準操作流程，做為2年研究期間與後續李斯特菌監測之標準檢驗方法；3)檢驗2019年度疑似群聚個案相關的環境追蹤檢體。第二年(2020年)進行1)建立可供跨機關李斯特菌病原菌株基因體序列資料分析機制，藉由產生菌株之基因指紋評估菌株間之親緣關係，並建立菌株追溯來源(strain tracking)的機制；2)建置跨機關李斯特菌基因體共同資

料庫，收集包括菌株基因指紋、人口學與流行病學資料，讓跨機關有關人員方便取得病原體菌株之相關資料；3)檢驗 2020 年度疑似群聚個案相關的環境追蹤檢體與 2020 年分離株之基因體定序。

本中心於 2018-2019 年執行「食媒性疾病之監測溯源與預警研究」計畫，執行李斯特菌基因體定序工作，該計畫結束後，2020 年的李斯特菌分離株基因體定序工作，將利用本計畫執行。

另本中心於 2017-2020 年執行「建置抗藥性微生物監測實驗室與巨量資料庫應用系統」計畫，分年進行人畜共通病原菌(含沙門氏菌、曲狀桿菌、李斯特菌)，2018 年也針對法定傳染病系統所通報之李斯特菌株同步進行抗藥基因監測，檢測結果為所有菌株攜帶 fosfomycin 抗藥基因(*fosX*)，4.3%帶有 tetracycline 抗藥基因(*tetM*)，顯示目前李斯特菌之抗藥性尚不嚴重。

2019 年計畫之主要執行內容為：

1. 環境檢體採檢方法之評估、標準方法之建立：

將市面上已經販售之各種李斯特菌環境檢體之採檢器材，透過已發表之論文與參考資料進行評估，採購適當之採檢器材以供本研究計畫環境檢驗使用。

2. 環境檢體檢驗方法靈敏度之評估與標準操作流程之建立：

- 1) 完成環境(冰箱)樣本採樣與檢驗之標準操作流程與實驗室標準操作手冊。
- 2) 環境檢體檢驗方法靈敏度之評估與標準操作流程之建立。

3. 本年度病例環境追蹤檢體之檢驗：

- 1) 配合本署業務組進行基層衛生人員採樣之教育訓練，以確保李斯特菌症監測調查之採樣品質。
- 2) 進行本年度李斯特菌症病例之環境檢體的檢驗。

二、材料與方法：

1. 環境檢體採檢方法之評估、標準方法之建立：

現行關於食媒相關病原之環境檢體採檢方法，主要係根據行政院衛生署於 82 年 5 月編印發行之食品中毒採樣操作手冊(21)，本研究將比較手冊所列採檢方法及相關文獻發表(19, 20, 22-24)之採檢方法(表一)針對不同採檢器材(如拭子及海綿)、不同浸潤液(如 PBS, saline, peptone water)、不同運送培養基及不同運送溫度(常溫或 4-8 °C)，對於環境檢體(冰箱採檢拭子)之李斯特菌檢出率，我們將挑選分離率高的方法步驟，在實驗室進行模擬操作，並參考美國 USDA (25)、歐盟 EFSA (26)、ISO18593 (27) 及 ISO11290-1 (28) 國際規範建立標準採檢流程。此外本研究將進一步參考 Methods for Recovering Microorganisms from Solid Surfaces Used in the Food Industry: A Review of the Literature (29) 此篇文獻所提到之應注意事項進行評估。

2. 環境檢體檢驗方法靈敏度之評估與標準操作流程之建立，和 2019—2020 病患環境追蹤檢體之檢驗：

環境檢體檢驗方法靈敏度評估方面，本研究將比較使用免疫磁珠吸附法(immune-magnetic separation, IMS)(30)處理過之環境檢體是否比傳統處理環境檢體使用之方法，更能提升環境檢體的檢驗分離率，並參考本實驗室已建立之雞肉李斯特菌(*Listeria* spp.)分離與鑑定的方法(附件 1)建立環境檢體檢驗方法標準操作流程與訂定操作手冊，做為 2 年研究期間與後續李斯特菌監測之標準檢驗方法，進行 2019—2020 年環境檢體之檢驗。

三、結果：

1. 完成環境(冰箱)樣本採檢器材採購與檢驗之標準操作流程，產生實驗室標準操作手冊：
 - 1)採購環境(冰箱)樣本採檢棒 DE (buffer)-Sponge-Stick、NB (buffer)-Sponge-Stick 各 100 支，BPW-SWAB 100 套，供環境檢驗使用。
 - 2)已完成環境(冰箱)樣本採樣與檢驗之實驗室標準操作手冊—「李斯特菌環境檢體檢驗操作程序 RDC-SOP-R3-E13」(附件)。
2. 環境檢體檢驗方法靈敏度之評估與標準操作流程之建立：

利用已完成之實驗室標準操作手冊評估從市面上大型生鮮超市通路商與傳統市場各別採購 100 份豬絞肉與雞翅檢體進行李斯特菌之檢測，其中生鮮超市與傳統市場分別各 50 份(表一)。其分離統計結果如下：100 份豬絞肉檢體當中，檢測出李斯特菌陽性檢體有 73 份，其中 *L. monocytogenes* 有 43 份、*L. spp.*有 30 份(表二)。100 份雞翅檢體當中，檢測出李斯特菌陽性檢體有 55 份，其中 *L. monocytogenes* 有 25 份、*L. spp.*有 30 份(表三)。
3. 完成本年度李斯特菌症病例之環境檢體的檢驗
 - 1)配合本署業務組進行基層衛生人員採樣之教育訓練，以確保李斯特菌症監測調查之採樣品質，並於 9 月 4 日偕同基層衛生人員進行個案冰箱環境現場採樣，進行採樣相關技巧與注意事項宣導。
 - 2)李斯特菌個案疑似群聚感染通報與環境(冰箱)樣本採樣係依據本署「加強李斯特菌監測防治行動方針」內容，依規劃之「疑似群聚菌株操作型定義」進行圖譜分析結果通報，該定義為「4 個月內出現 2 名(含)以上確定病例，且其菌株 PFGE 圖譜型別相同者」(圖一)。本(108)年度監測起始日為 5 月 6 日，累計至 9 月 10 日共通報 8 個疑似聚集菌株圖譜(表四)，分別於 8 月 30 日與 9 月 9 日陸續啟動通報個案(圖譜型別為 Lmp.023_Lmc.011、Lmp.002_Lmc.004)，後續仍進行環境檢體

採檢與檢驗，截至 11 月 15 日止共計採檢 10 例個案居家冰箱環境檢體(圖譜型別分別為 Lmp.023_Lmc.011 有 7 例、Lmp.002_Lmc.004 有 3 例)，檢驗結果皆呈陰性。

四、討論：

本研究測試所建立的李斯特菌檢驗方法的靈敏度，從測試的(絞)豬肉與雞肉(翅)樣本分別有 73%與 55%的 *Listeria* spp.分離率，其中超商絞豬肉的 *Listeria* spp.分離率高達 94%，顯示本檢驗方法具有高靈敏度。

2019 年截至 11 月 10 日，全國通報實驗室李斯特菌症確認的總數有 158 個病例，較去年(2018 年)同期的 151 個病例略為增加。符合通報個案數之圖譜型別有 Lmp.023_Lmc.011 與 Lmp.002_Lmc.004 兩型，共計採檢 10 例個案居家冰箱環境檢體(圖譜型別分別為 Lmp.023_Lmc.011 有 7 例、Lmp.002_Lmc.004 有 3 例)，檢驗結果皆呈陰性。

因為李斯特菌症是常見的食源性疾病的病原體，潛伏期長、發病率低，且大多是”散發性”病例的形式進行通報，因此回溯追查病例間之流病關聯性與感染來源相當困難，導致目前符合通報個案之環境檢體數僅有 10 例且其檢驗結果皆呈陰性。

五、結論與建議：

結論

由於本計畫之執行係由今年 8 月 1 日起才正式啟動，至今僅有 3 個多月，因此第一年(2019 年)的執行成效以建立採檢、檢驗標準方法與檢驗病例之環境追蹤檢體為主，環境檢體數預計會隨著李斯特菌症確認數的累積而提高通報個案數。第二年(2020 年)的執行進度除了持續檢驗病例之環境追蹤檢體，並將進行 2020 年分離菌株之基因體序列分析與建立跨機關比對菌株基因指紋的機制。

建議

我們非常希望能夠將李斯特菌檢測與分析以跨機關中綱計畫的方式進行監

測與研究的合作，但在計畫申請的限制下，目前只能在各機關內部研究計畫分別執行，未能整合。建構跨機關資料庫在本機關已有先例(食媒病原體共同基因資料庫)，未來該項李斯特菌基因體資料庫完成後，亦將納入整體資料庫體系運作與簽跨機關使用之正式契約書。

六、計畫重要研究成果及具體建議：

本計畫執行雖然僅有 3 個月，但是已完成環境(冰箱)樣本採樣與檢驗之標準操作流程、實驗室檢驗標準操作手冊，並進行環境檢體檢驗方法靈敏度之評估與標準操作流程之建立。儘管目前符合通報個案之環境檢體數僅有 10 例且其檢驗結果皆呈陰性，然而將隨著李斯特菌症病例數不斷累積，可預期到第二年(2020 年)將逐漸增加通報個案數與環境檢體採檢數，而今年的研究成果將成為明年度陸續展開相關研究之基礎。

七、參考文獻：

1. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SV, et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q.* 2015;35(4):211-35.
2. Walker SJ, Archer P, Banks JG. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol.* 1990 Feb;68(2):157-62.
3. Membre JM, Kubaczka M, Dubois J, Chene C. Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products. *J Food Prot.* 2004 Mar;67(3):463-9.
4. Angelo KM, Jackson KA, Wong KK, Hoekstra RM, Jackson BR. Assessment of the incubation period for invasive listeriosis. *Clin Infect Dis.* 2016 Dec 1;63(11):1487-9.
5. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.* 2013 Jan 10;13:11.
6. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.* 1988 Sep 29;319(13):823-8.
7. Imanishi M, Routh JA, Klaber M, Gu W, Vanselow MS, Jackson KA, et al. Estimating the attack rate of pregnancy-associated listeriosis during a large outbreak. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2015;2015:201479.
8. Wikipedia. 2011 United States listeriosis outbreak. [f] 2019 e [cited 2019 Jan 19]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/2011_United_States_listeriosis_outbreak
9. Whitworth J. South Africa declares end to largest ever *Listeria* outbreak. *Food Safety News* [f] 2018 September 4, 2018 [cited 2019 Jan 19]; Available from: <https://www.foodsafetynews.com/2018/09/south-africa-declares-end-to-largest-ever-listeria-outbreak/>
10. World Health Organization. Listeriosis – Australia. [f] 2018 April 9, 2018 [cited 2019 Jan 19]; Available from: <https://www.who.int/csr/don/09-april-2018-listeriosis-australia/en/>
11. Hong MK, Yang CK. Congenital listeriosis: a review of cases in Taiwan since 1990 until

2011. Taiwan J Obstet Gynecol. 2012 Jun;51(2):289-91.
12. Huang YT, Liao CH, Yang CJ, Teng LJ, Wang JT, Hsueh PR. Listeriosis, Taiwan, 1996-2008. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep;17(9):1731-3.
13. Hsieh WS, Tsai LY, Jeng SF, Hsu CH, Lin HC, Hsueh PR, et al. Neonatal listeriosis in Taiwan, 1990-2007. *Int J Infect Dis*. 2009 Mar;13(2):193-5.
14. Huang SL, Chou YT, Hsieh YC, Huang YC, Lin TY, Chiu CH. Epidemiology and clinical characteristics of *Listeria monocytogenes* bacteremia in a Taiwanese medical center. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Dec;43(6):485-90.
15. 林民浩, 葉芝廷, 鄭皓元, 劉宇倫, 郭宏偉, 李佳琳, et al. 應用實驗室傳染病自動通報系統於李斯特菌感染監測：現況與自動研析機制之建置. 疫情報導. 2017 June 13;33(11):189-97.
16. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):7-15.
17. Wong HC, Chao WL, Lee SJ. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. *Appl Environ Microbiol*. 1990 Oct;56(10):3101-4.
18. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Estelle H, Laurent E, Fredriksen N, et al. Real-Time whole-genome sequencing for surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerging Infectious Disease journal*. 2017;23(9):1462.
19. Jackson TC, Acuff GR, Lucia LM, Prasai RK, Benner RA, Terry CT. Survey of residential refrigerators for the presence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 1993;56(10):874-5.
20. Beumer RR, te Giffel MC, Spoorenberg E, Rombouts FM. *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiol Infect*. 1996 Dec;117(3):437-42.
21. 衛生福利部食品藥物管理署. 食品中毒採樣操作手冊(第三版). 2001.
22. Maktabi S, Jamnejad A, Faramarzian K. Contamination of household refrigerators by *Listeria* species in Ahvaz, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2013;6(3):301-5.
23. Sergelidis D, Abraham A, Sarimvei A, Panoulis C, Karaioannoglou P, Genigeorgis C.

Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *Int J Food Microbiol.* 1997 Feb;34(2):171-7.

24. Jackson V, Blair IS, McDowell DA, Kennedy J, Bolton DJ. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control.* 2007 2007/05/01;18(4):346-51.

25. United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service OoPHS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry and egg products, ready-to-eat siluriformes (Fish) and environmental samples. 2013.

26. the European Food Safety Authority (EFSA) AA, Léna Barre, Liesbeth Jacxsens (UGent) , Ernesto Liebana, Winy Messens, Eleonora Sano and Maria Teresa da Silva Felicio. Urgent scientific and technical assistance to provide recommendations for sampling and testing in the processing plants of frozen vegetables aiming at detecting *Listeria monocytogenes*. 2018.

27. ISO 18593 (Microbiology of the food chain -- Horizontal methods for surface sampling). 2018.

28. Conrad CC, Kim S, Claudia N-B, Todd C, Tim M. Farm fairs and petting zoos: A review of animal contact as a source of zoonotic enteric disease. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2017;14(2):59-73.

29. Ismail R, Aviat F, Michel V, Le Bayon I, Gay-Perret P, Kutnik M, et al. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Nov 14;10(11):6169-83.

30. Du M, Li J, Zhao R, Yang Y, Wang Y, Ma K, et al. Effective pre-treatment technique based on immune-magnetic separation for rapid detection of trace levels of *Salmonella* in milk. *Food Control.* 2018 2018/09/01;91:92-9.

八、圖、表

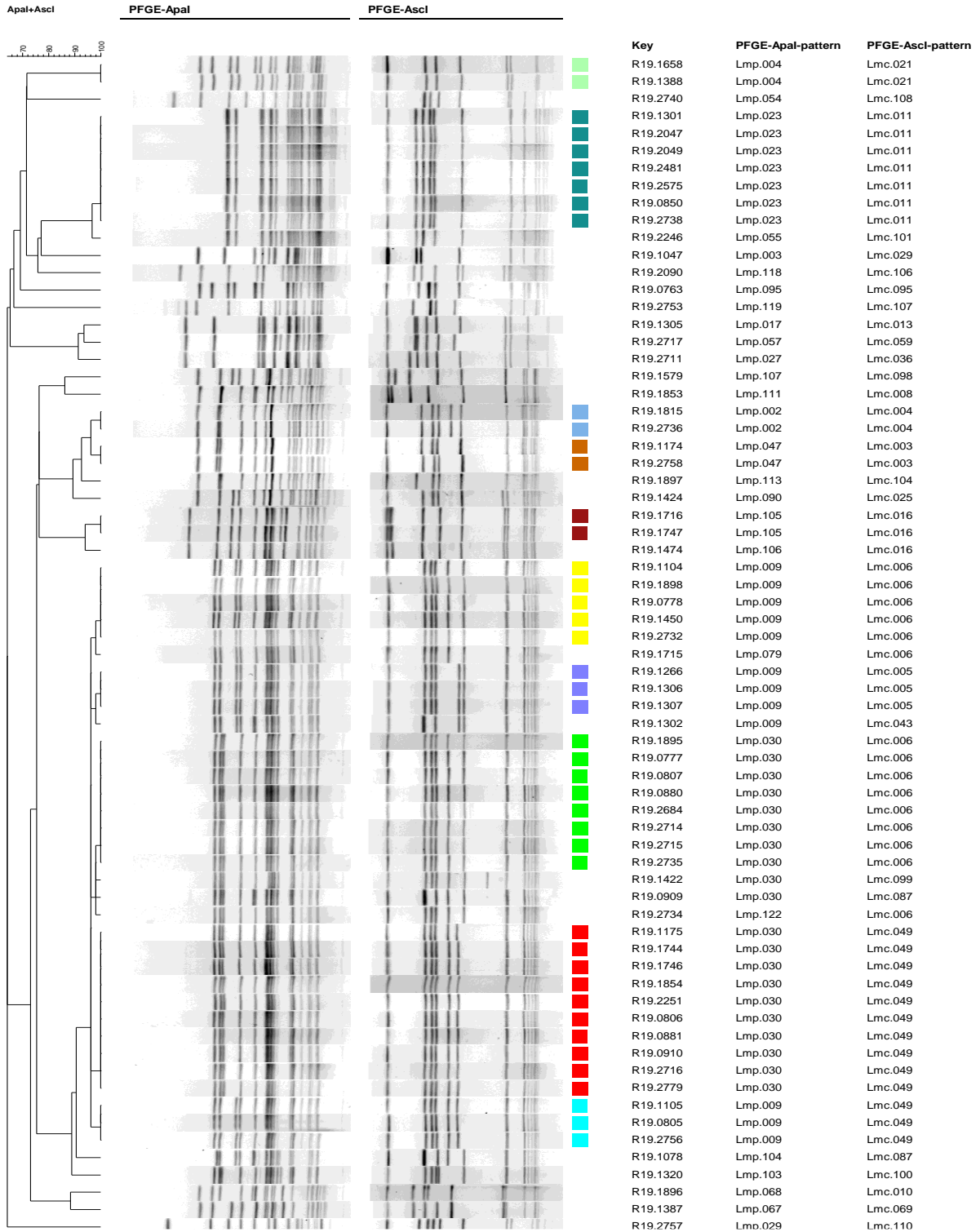


圖 1：本(108)年度李斯特菌症分離株之 PFGE 圖譜。2 種 PFGE 圖譜(Ascl, Apal 酵素切割)

皆相同之群聚，以顏色標示。

表一：評估李斯特菌檢測之肉品來源與種類

肉品來源與種類	生鮮超市	傳統市場	小計
豬絞肉	50	50	100
雞翅	50	50	100
小計	100	100	200

表二：豬絞肉檢體當中，檢測出李斯特菌陽性檢體個數與百分比

豬絞肉	<i>L. monocytogenes</i> (%)	Other <i>Listeria</i> <i>spp.</i> (%)	陰性 (%)	Listeria 陽 性件數 (%)
生鮮超市	40 (80)	7 (14)	3 (6)	47 (94)
傳統市場	3 (6)	23 (46)	24 (48)	26 (52)
小計	43 (43)	30 (30)	27 (27)	73 (73)

表三：雞翅檢體當中，檢測出李斯特菌陽性檢體個數與百分比

雞翅	<i>L. monocytogenes</i> (%)	Other <i>Listeria</i> <i>spp.</i> (%)	陰性 (%)	Listeria 陽 性件數 (%)
生鮮超市	24 (48)	13 (26)	13 (26)	37 (74)
傳統市場	1 (2)	17 (34)	32 (64)	18 (36)
小計	25 (25)	30 (30)	45 (45)	55 (55)

表四、疑似聚集菌株通報與環境採檢件數

流水號	圖譜型別	提案日期	環境採檢
1	Lmp.030_Lmc.049	108/05/28	未採
2	Lmp.030_Lmc.006	108/05/28	未採
3	Lmp.009_Lmc.005	108/06/24	未採

4	Lmp.009_Lmc.006	108/06/24	未採
5	Lmp.009_Lmc.049	108/06/24	未採
6	Lmp.023_Lmc.011	108/08/06	7 例
7	Lmp.002_Lmc.004	108/09/09	3 例
8	Lmp.047_Lmc.003	108/09/09	未採

九、附件



衛生福利部疾病管制署
檢驗及疫苗研製中心

李斯特菌環境檢體檢驗操作程序
RDC-SOP-R3-E13
(第 1.0 版)

制 定		審 查		核 准	
日期：108 年 9 月 10 日		日期：108 年 9 月 12 日		日期：108 年 9 月 16 日	

【年度文件審查簽章 Annual Documenting Review】

審查年度	日期	品管人員	實驗室負責人/科長
109 (2020)			
110 (2021)			
111 (2022)			

年度文件審查 Annual Documenting Review

審查年度	審查內容	審查者簽章
109	1. 上次審查後之修改次數：_____次。 2. 上述修改之程序和紀錄： <input type="checkbox"/> 符合 <input type="checkbox"/> 不符合，事證或原因： 3. 本文件方法或程序審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 4. 生物參考區間審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 5. 檢體採集量審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 6. 文件內容審查： <input type="checkbox"/> 符合，不需修正 <input type="checkbox"/> 不符合，修正如附件 (<input type="checkbox"/> 文件制訂/變更申請單 RDC-QR-0301-02 <input type="checkbox"/> 本文件修訂記錄)。 7. 其他審查內容及記錄：	品管人員/文管人員 實驗室負責人/科長 品質負責人(QM/QP)
	是否重新發行新版本： <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是；預定完成日期： 年 月 日	審查日期：
110	1. 上次審查後之修改次數：_____次。 2. 上述修改之程序和紀錄： <input type="checkbox"/> 符合 <input type="checkbox"/> 不符合，事證或原因： 3. 本文件方法或程序審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 4. 生物參考區間審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 5. 檢體採集量審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 6. 文件內容審查： <input type="checkbox"/> 符合，不需修正 <input type="checkbox"/> 不符合，修正如附件 (<input type="checkbox"/> 文件制訂/變更申請單 RDC-QR-0301-02 <input type="checkbox"/> 本文件修訂記錄)。 7. 其他審查內容及記錄：	品管人員/文管人員 實驗室負責人/科長 品質負責人(QM/QP)
	是否重新發行新版本： <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是；預定完成日期： 年 月 日	審查日期：
111	1. 上次審查後之修改次數：_____次。 2. 上述修改之程序和紀錄： <input type="checkbox"/> 符合 <input type="checkbox"/> 不符合，事證或原因： 3. 本文件方法或程序審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為 4. 生物參考區間審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 5. 檢體採集量審查： <input type="checkbox"/> 符合，可繼續使用 <input type="checkbox"/> 不適用 <input type="checkbox"/> 不符合，修正為： 6. 文件內容審查： <input type="checkbox"/> 符合，不需修正 <input type="checkbox"/> 不符合，修正如附件 (<input type="checkbox"/> 文件制訂/變更申請單 RDC-QR-0301-02 <input type="checkbox"/> 本文件修訂記錄)。 7. 其他審查內容及記錄：	品管人員/文管人員 實驗室負責人/科長 品質負責人(QM/QP)
	是否重新發行新版本： <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是；預定完成日期： 年 月 日	審查日期：

文件修訂紀錄					
版次	修訂內容			修訂頁碼	修訂日期
修訂次數	日期	版本	修訂	審查	核准
第一次修訂					
第二次修訂					
第三次修訂					
第四次修訂					

註：本品質文件僅供本中心人員執行作業使用，未經主管書面同意，禁止翻印。

文件修訂閱讀紀錄

實驗室/科別： 中區實驗室

版次	導讀/閱讀日期	人員簽名
1.0	日期： <input type="checkbox"/> 導讀 導讀人： <input type="checkbox"/> 個人閱讀	
	日期： <input type="checkbox"/> 導讀 導讀人： <input type="checkbox"/> 個人閱讀	
	日期： <input type="checkbox"/> 導讀 導讀人： <input type="checkbox"/> 個人閱讀	
	日期： <input type="checkbox"/> 導讀 導讀人： <input type="checkbox"/> 個人閱讀	
	日期： <input type="checkbox"/> 導讀 導讀人： <input type="checkbox"/> 個人閱讀	

- 1 目的：完成疑似群聚圖譜個案的環境(冰箱)樣本採樣與檢體中李斯特菌 (Listeria) 的分離與鑑定檢驗之標準操作流程。
- 2 檢體種類與採檢容器
 - 2.1 檢體種類：環境檢體 (冰箱層架、側邊及壓條縫隙等位置)
 - 2.2 採檢容器：含有 10 mL BPW 之棉棒與 10 mL D/E 之海棉片
- 3 原理概述

以特定培養液與培養基分離出李斯特菌，並利用細菌生長菌體型態，依據菌體本身的結構蛋白進行 MALDI-TOF 質譜儀質量偵測與分析。
- 4 檢驗性能特徵

診斷特異性 100%。
- 5 病人準備

NA。
- 6 試劑耗材
 - 6.1 試劑
 - 6.1.1 UVM Modified Listeria Enrichment Broth (啟新 DIF222330 500g/Bottle)。
 - 6.1.2 Fraser broth (啟新 CMP0200521 10 mL, 40 EA/ Box)。
 - 6.1.3 Chromogenic Listeria Agar (啟新 CMP0100521 40 PC/ Box)。
 - 6.1.4 Brain Heart Infusion Agar (啟新 BHI, CMP0100341 40 PC/ Box)
 - 6.1.5 Whirl Pak™ bag
 - 6.2 耗材
 - 6.2.1 10 uL 接種環 (loop)。
 - 6.3 個人防護耗材
 - 6.3.1 外科口罩。
 - 6.3.2 實驗衣。
 - 6.3.3 手套。
- 7 儀器設備
 - 7.1 第二級生物安全櫃。
 - 7.1.1 使用前確認具年度合格標籤，不合格者停用。
 - 7.2 高壓滅菌鍋
 - 7.2.1 使用前確認具合格檢測標籤，不合格者停用。
 - 7.3 化學排氣櫃
 - 7.3.1 7.4.1 使用前確認具合格檢測標籤，不合格者停用。
 - 7.4 35±2°C 培養箱與震盪培養箱。
 - 7.5 MALDI-TOF 質譜儀。
- 8 環境與設施安全(請列實驗室生物安全等級)

處理檢體、接種時須於生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室內操作。依據 RDC-SOP-V1-B09「BSL3 實驗室個人防護裝備穿脫標準操作程序」作業及 RDC-SOP-V1-B15「BSL3 實驗室人員進出標準操作程序」。
- 9 校正程序

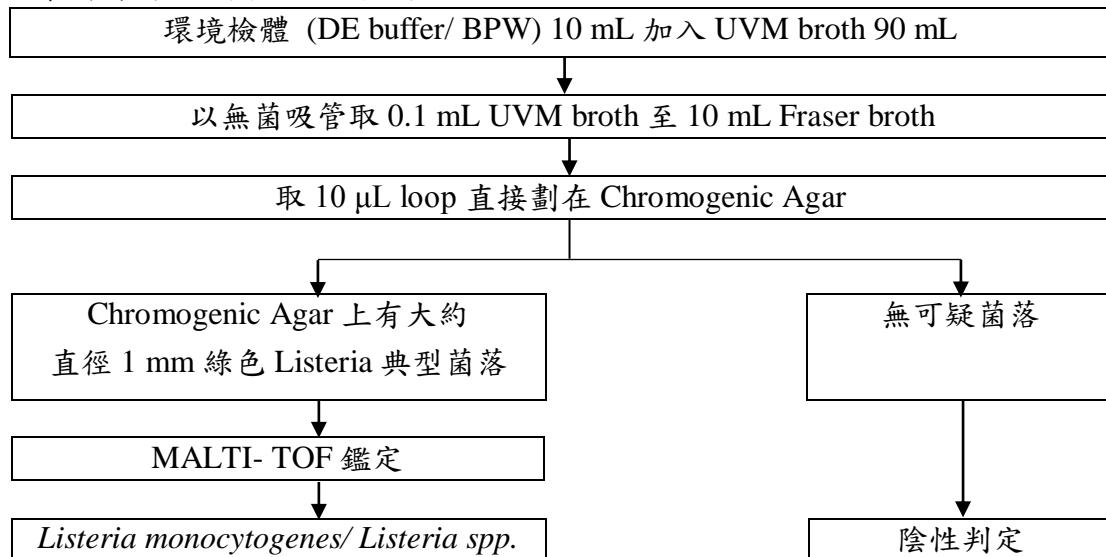
NA。
- 10 品質管制
 - 10.1 內部品管：採用標準菌株進行品管。

- 10.2 外部品管：NA。
- 11 檢驗步驟
- 11.1 檢體前處理
- 11.1.1 全程需於生物安全櫃內操作。
- 11.2 檢驗步驟
- 11.2.1 檢體處理：環境檢體與 UVM broth 以 1：9 的比例(配製如附錄 A 1)均勻混合後，放進 35±2°C 100 rpm/min 培養箱震盪培養。初次增菌培養(Primary Enrichment)於 35±2°C 培養箱培養 20-26 小時。
- 11.2.2 第一次分離培養：取 100 µL 初次增菌培養液加入 10 mL Fraser broth，於 35±2°C 100 rpm/min 培養箱震盪培養 20-26 小時，後進行第二次分離培養。
- 11.2.2 .1 若 Fraser broth 有顏色變深的情形，進行第二次分離培養。
- 11.2.2 .2 若 Fraser broth 無顏色變深的情形，則繼續再培養一天後檢查顏色變化，顏色變深則進行第二次分離培養，無變色則不進行第二次分離培養。
- 11.2.3 第二次分離培養：取 10 µL loop 將再次增菌液 (Fraser broth) 直接劃在 Chromogenic Listeria Agar，於 35±2°C 培養箱培養 20 -26 小時。
- 11.2.4 菌株鑑定：
- 11.2.4 .1 挑取 Chromogenic Listeria Agar 上至多 5 顆大約 1 mm 淺綠色、白色外環狀的典型菌落，接種至 BHI 培養基，於 35±2°C 培養 20-26 小時後進行 MALDI-TOF 鑑定。若沒有典型菌落則繼續培養 20-26 小時後，再檢查菌落。
- 11.2.4 .2 MALDI-TOF 鑑定：參考疾管署 ISO 文件 SOP-I16 微生物鑑定質譜儀標準操作程序 v2.0。
- 11.2.5 菌株保存：每一檢體至多保存 2 株 *L. monocytogenes* 菌株。
- 11.2.2 鑑定
- MALTI-TOF 鑑定：依“疾管署 RDC-SOP-R3-E09 微生物鑑定質譜儀標準操作程序”操作。
- 11.3 檢驗後處理
- 11.3.1 廢棄物處理：檢驗過程之物品、微生物及剩餘檢體等感染性事業廢棄物，應先以標有生物危險標誌的專用紅色廢棄袋裝妥密封，貼上化學指示劑，再以 121°C，每平方公分 1.06 公斤以上壓力，60 mins 高壓滅菌後，由合約清理廠商處理。
- 11.3.2 檢驗後工作檯面以 70% 酒精或其他適用消毒劑清潔。
- 12 干擾與交互反應
- NA
- 13 結果判定
- 13.1 判讀標準
- Chromogenic Agar 上有大約直徑 1 mm 綠色 *Listeria* 典型菌落，並經過 MALTI- TOF 鑑定確認者為陽性結果。
- 14 生物參考區間/臨床決策值
- NA
- 15 檢驗結果的可報告區間
- 15.1 陽性：*Listeria monocytogenes* 或 *Listeria sp.*
- 15.2 陰性：non-*Listeria*、No growth。

- 16 結果超出量測區間之操作說明
NA
- 17 危急值/異常值
NA
- 18 臨床意義
NA
- 19 變異的潛在來源
 - 19.1 採樣運送時：採檢部位、採檢使用之輸送器材、運送時間和溫度。
 - 19.2 培養溫度。
 - 19.3 潛在變異的來源：接種劃線技術、菌落型態辨識。
- 20 參考文件
 - 20.1 RDC-QP-1601 安全衛生作業程序。
- 21 衛生福利部疾病管制署/傳染病介紹/第四類法定傳染病/李斯特菌症。

附錄

李斯特菌分離與鑑定流程圖



衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-112520

計畫名稱：李斯特菌症監測防治-建立實驗室檢驗與菌株分析量能

計畫主持人：邱乾順

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	今年剛執行計畫，樣本再增多才能定論	感謝委員的建議。累積至 12 月 18 日已經有 13 例環境李斯特菌檢測，樣本持續累積中。	無
2	往部門間作戰合作前進，法傳後可大量提供做公眾溝通使用	感謝委員的建議。我們將在定期會議中提報研究成果予相關部會，並請其他部會提供建議以供參考。希望透過此方式整合訊息之後，可以提供給公眾更完整的資訊以做為溝通之橋梁。	無
3	研究發現可轉譯為民眾易懂之語言，以進行衛教及風險溝通	感謝委員的建議。計畫相關結論皆積極提供予本署權責單位做為參考，權責單位也持續更新各項訊息使之口語化，以便更容易讓民眾理解，使疾病防治的衛教族群更清楚明瞭。	無

備註：請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。