

一滴乳驗出影響乳質的菌種

Micro-Detection on Bacteria Varieties in Milk for Quality Control

行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所

涂柏安 (Mr. Po-an Tu)

中華民國109年8月26日



牛奶中的有害微生物的來源

- 健康牛隻分泌的乳汁應該是無菌的。
- 有害微生物的污染源包含：
 - 牛隻疾病（乳房炎或其他疾病）。
 - 牛隻體表微生物。
 - 環境微生物（空氣、土壤、細塵）、水源、糞便、牛床、青貯。
 - 牧場設備（擠乳機、管線、擠乳用品、排水、收乳車）。
 - 昆蟲病媒（蒼蠅、蚊蟲等）。
 - 牧場人員（擠乳及收乳人員）。



常見的牛奶中有害微生物

Mammary gland health status	Cow herd health status	Production environment	Production land water source
<i>S. aureus</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> 李斯特菌	Hepatitis A virus
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Salmonella</i> spp. 沙門氏菌群	<i>Leptospira</i> spp.*
<i>Streptococcus</i> spp.	subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 腸出血性	* <i>Bacillus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Brucella</i> spp.	<i>E. coli</i> (STEC) 大腸桿菌	<i>licheniformis</i>
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA-LA	<i>E. coli</i> (EHEC)	* <i>Bacillus subtilis</i>
(B-hemolytic)	<i>Salmonella</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> 耶爾辛氏菌	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>typhimurium</i> phage	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Clostridium</i>
Lancefield C group)	type 561 (STM D17)	<i>Campylobacter jejuni</i> 曲狀桿菌	<i>disporicum</i>
<i>Corynebacterium ulcerans</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus</i> spp.
		<i>Citrobacter freundii</i>	Aflatoxin M1
		<i>Bacillus cereus</i> 仙人掌桿菌	Mycotoxin B1
		* <i>Cryptosporidium parvum</i>	
		<i>Coxiella burnetii</i> *	
		<i>Toxoplasma gondii</i> *	

*Occasionally involved in enteric diseases

(Velazquez-Ordoñez et al., 2019)

有害微生物對乳製品的影響

- 降低乳製品的品質及保存期限。
 - 產品風味改變，酸化及苦化。
- 可能違反食品法規及通路的要求。
 - 食品衛生管理法（生菌數、大腸桿菌群、大腸桿菌、李斯特菌、沙門氏菌、金黃色葡萄球菌腸毒素）
- 造成食安風險及傳播疾病。

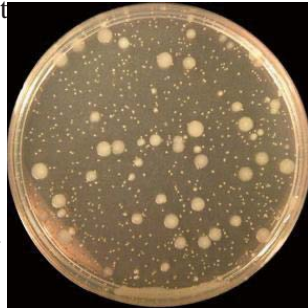
INVITED ARTICLE FOOD SAFETY
Frederick J. Angulo, Section Editor

Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat

Jeffrey T. LeJeune¹ and Páivi J. Rajala-Schultz²
¹Ohio Animal Health Research Program, Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, and ²Department of Veterinary Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Columbus, Ohio

標準平板測試法 Standard Plate Counts

- 檢測生乳總生菌計數 (total bacteria count TBC)
- 生乳樣品經10倍序列稀釋後，以平板計數培養基 (Plate count agar, PCA) 35°C 恆溫培養48小時後的細菌菌落數。
- 生乳品質計價基準要求生乳總生菌數須低於 10^5 CFU's/mL，衛生的擠乳及適當的4°C冷藏應可達 $10^4 \sim 10^5$ CFU's/mL以下



5

預培養計數法 Preliminary Incubation Count

- 檢測生乳低溫菌計數 (psychrotrophic bacteria) ，
- 生乳樣品預先以低溫12°C培養18小時後，依標準平板測試法進行計數。
- 由於來自於土壤、糞便及污染的水中有害微生物能適應低溫並持續增生，此法須與標準平板測試法計算之總生菌數進行比較，一般而言預培養計數法會大於標準平板測試法。
 - 二者差距若超過3-4倍時，可能代表有來自土壤、水的環境有害微生物污染。
 - 二者皆高時，牛隻乳房炎細菌為最可能的原因，且擠乳設備、管線的降溫效能及清潔效能可能不佳使有害細菌累積。
 - 二者皆低表示牛群健康、環境清潔及擠乳設備狀態良好。

6

實驗室巴氏殺菌計數法 Lab Pasteurized Count

- 測量耐熱細菌 (thermoduric bacteria) 的方法。
- 生乳樣品62.8°C加熱30分鐘，依標準平板測試法進行計數。
- 耐熱細菌常見於土壤、牛糞、發酵飼料、臥床墊料中，通過產生芽孢抵禦高溫，經過巴氏殺菌後依然可以存活，破壞牛奶製品的質量，影響有效期限。
- 乳房清潔不良可能將耐熱細菌帶入擠乳系統中，一般認為100 CFU's/mL以下為可接受。

7

生乳總生菌數快速檢測技術 FOSS Bactoscan Analysis

- 採用流式細胞原理，對乳中微生物進行溶解及核酸染色，並進行計數。
- 由於無需進行培養，因此速度較快 (50-150樣品/小時)。
- 數據單位CFU's/mL。



8

一滴乳菌種鑑定 Bacteria Species Evaluation



細菌培養需耗費時間



部分細菌無法培養計數



現場即時診斷的需求

一滴乳菌種核酸鑑定的優勢

縮短檢測時間

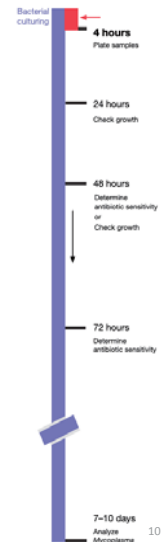
- 僅需2.5-3小時得到診斷結果。
- 簡單方便的微生物核酸萃取。
- 結果判讀容易。
- 單次診斷15種以上的致病性微生物（及抗藥性基因）。

準確性高

- 高敏感度及準確度。
- 無論致病性微生物是可培養的、培養抑制的或是不可培養的，皆可被偵測到。
- 可自動化。

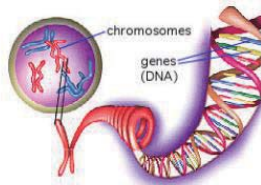
支援現場診斷

- 快速準確的現場診斷。
- 精準的用藥治療，降低抗生素使用量。



一滴乳菌種鑑定適用樣本

- 總乳。
- 添加防腐劑的生乳 (e.g., with bronopol)
 - 添加防腐劑的生乳樣本可不用冷藏運送。
- 冷凍牛乳。
- 乳房炎牛乳。
- 高體細胞數的牛乳。



新竹分所參與ICAR乳微生物鑑別能力試驗

樣品抵達

微生物核酸萃取

qPCR擴增

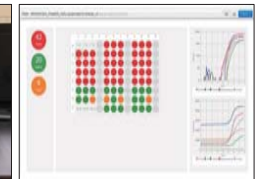
發光訊號解讀



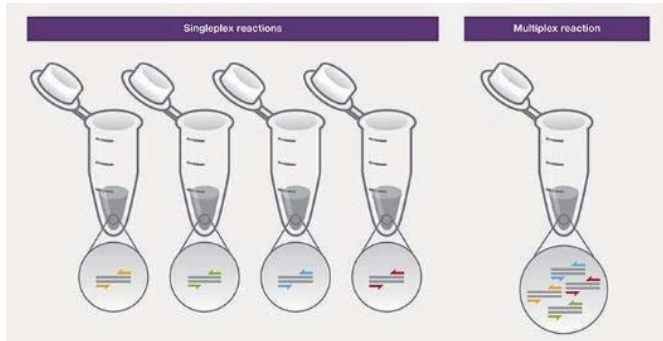
約 1 小時



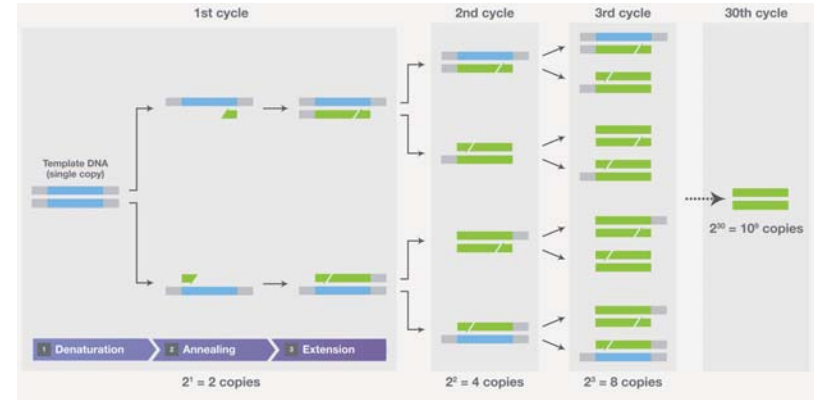
約 1.5-2 小時



多重聚合酶鏈式反應 Multiplex PCR



有害微生物DNA擴增 DNA amplification



菌種鑑定結果判讀

Color results depending of call status

48 Positive
26 Negative
10 Invalid
38 Invalid

- 48 -> At least 1 target gives a positive result (below cut off)
- 26 -> Target for pathogens tested are negative
- 10 -> At least 1 target give a negative call but there is a Ct above cut off
- 38 -> Result not valid, needs retesting

Each dot corresponds to one well

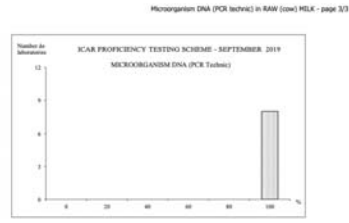
可偵測 微生物菌種	ThermoFisher SCIENTIFIC	DNA DIAGNOSTIC	可偵測 微生物菌種	ThermoFisher SCIENTIFIC	DNA DIAGNOSTIC
	VetMAX MastiType multiplex qPCR kits	DNA Diagnostic M4BDFT		VetMAX MastiType multiplex qPCR kits	DNA Diagnostic M4BDFT
Staphylococcus aureus	●	●	Pseudomonas		●
Staphylococcus spp. (including all major coagulase negative staphylococci)	●	●	Serratia marcescens	●	
Streptococcus agalactiae	●	●	Corynebacterium bovis	●	
Streptococcus dysgalactiae	●	●	Trueperella pyogenes and/or Peptoniphilus indolicus	●	
Streptococcus uberis	●	●	Staphylococcal β- lactamase Gene (penicillin-resistant gene)	●	●
Streptococcus spp.		●	Mycoplasma bovis	●	●
Escherichia coli	●	●	Mycoplasma spp.	●	●
Enterococcus spp.	●	●	Bacillus/Clostridia		●
Klebsiella oxytoca and/or K. pneumoniae	●	●	Yeast	●	
			Prototheca spp.	●	●

ICAR proficiency test cow raw milk microorganism DNA (PCR method)

2019年9月能力試驗

LIST OF THE PARTICIPANTS ICAR
ICAR PROFICIENCY TEST
RAW MILK
D N A PCR technique
September 2019

Name	City	Country
DNA Diagnostic	Risikov	Denmark
Eurofins MIK Testing Sweden AB	Jönköping	Sweden
LVK	Hobro	Denmark
National Milk Laboratory	Wolverhampton	UK
NorthStar Cooperative	Grand Ledge	USA
Pulsed-Field	St. Louis	USA
Taiwan Livestock research Institute	Tainan	Taiwan
Thermo Fisher Scientific Oy	Vantaa	Finland



2019 ICAR PT 0902

檢測項目	參加該項能力實驗室 數目	新竹分所乳品質檢驗室參 與代碼	D value (編錄定章條釋)	名次 (編少編釋)	名次百分比 (編少編釋)	ICAR 評價	前次名次百分 比
乳房炎微生物 Microorganism DNA	9	2	定性：正確率 100%，5/5 個試驗樣本檢測正確			為本次新增項目	

ICAR proficiency test cow raw milk microorganism DNA (PCR method)

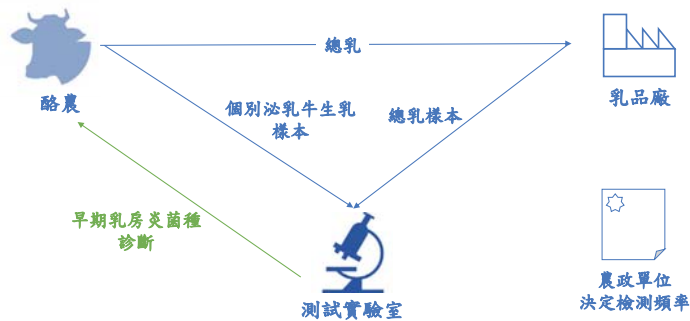
2020年3月能力試驗

SAMPLES	STRAINS	LEVEL
46	Staphylococcus aureus Escherichia coli	110.10 ³ CFU/ml 98.10 ³ CFU/ml
47	Staphylococcus aureus	110.10 ³ CFU/ml
48	Escherichia coli	98.10 ³ CFU/ml
49	Klebsiella oxytoca	130.10 ³ CFU/ml
50	Staphylococcus haemolyticus	180.10 ³ CFU/ml

March 2020 ICAR 能力試驗結果整理 (定性部分)

檢測項目	數值 比較	樣品 1	樣品 2	樣品 3	樣品 4	樣品 5	數據來源
乳房炎微生物 Microorganism DNA (細菌種類)	填報 檢測值	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Staph. Spp.</i>	40_ICARPT0320
	ICAR 參考值	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Staph. haemolyticus</i>	能力試驗報告 P.58
	數值 差異	正確	正確	正確	正確	正確	自填 3.6

乳房炎菌種診斷與監測 Mastitis Surveillance and Diagnostic



乳房炎菌種診斷與監測 Mastitis Surveillance and Diagnostic

- 農政單位**
 - 降低抗生素使用過量及細菌抗藥性風險
 - 增進農場動物福祉
 - 維護牛乳及乳製品供應鏈安全
- 測試實驗室**
 - 增加現有乳樣檢測項目
 - 開發新技術的現場應用
 - 作為第三方檢測參考基準
- 乳品廠**
 - 取得優良品質的生乳
 - 提升產品品質
 - 降低食安風險
- 酪農**
 - 提升生乳品質，獲取更高的收購價
 - 降低因乳房炎或其他疾病造成的牛乳生產損失
 - 降低獸醫診斷、治療費用及因疾病乾乳的成本



