

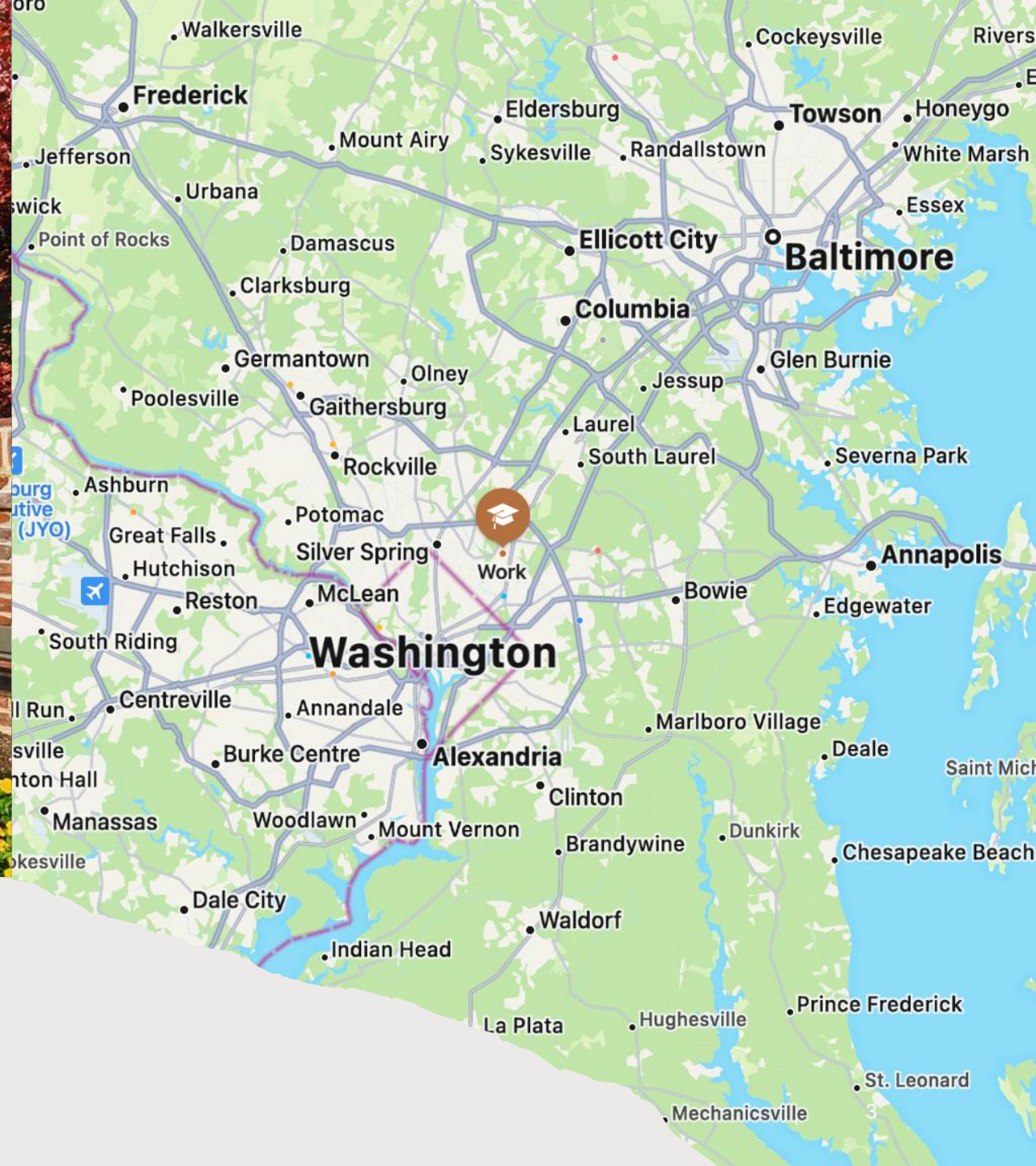
# 利用噬菌體防治食媒性病原微生物之研究

防檢署-肉品檢查組 董全緯

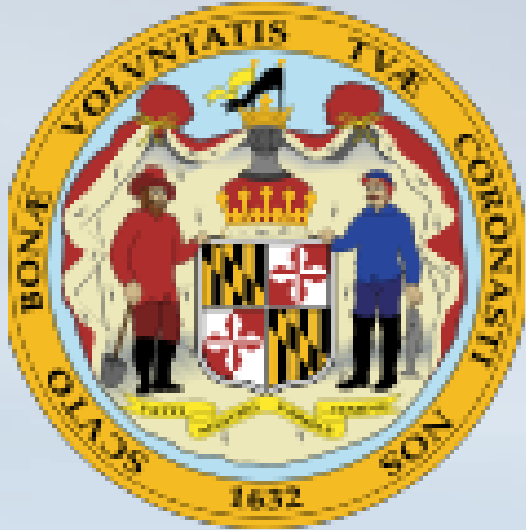


## 馬里蘭大學

- 馬里蘭大學學院市校區 (University of Maryland, College Park)
- 地點：美國馬里蘭州學院市 ( College Park, Maryland )
- 創立年份：1856 年
- 學校類型：公立研究型大學



馬大在那裡？



# 馬里蘭州 Maryland State



- 是美國土地面積最小以及人口密度最高的州之一。本州最大的城市為 Baltimore，首府為Annapolis。
- 馬里蘭州其為美國最富裕的州之一。

# 食媒性病原微生物

➤ 世界各國常見食媒性病原微生物：

- 沙門氏菌(*Salmonella*)
- 彎曲菌(*Campylobacter*)
- 單核細胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)

➤ 衛生福利部疾病管制署統計，臺灣近年李斯特菌病例增加，且平均死亡率近35%，107年1月1日起將李斯特菌感染症列為法定傳染病。



# 食媒性病原微生物





109年統計資料，在細菌食物中毒症：

- Top 1:沙門氏菌
- Top 2:仙人掌桿菌
- Top 3:腸炎弧菌
- Top 4:金黃色葡萄球菌等



衛福部110年實施「食品中微生物衛生標準」：以沙門氏菌、單核細胞增生李斯特菌，以取代傳統之指標菌大腸桿菌、生菌數、大腸桿菌群，使監測的結果更具有風險代表性。

# 美國盛行之食媒性病原微生物

Active surveillance in 10 US states (2017–2020)				
Pathogen	Cases	Hospitalizations	Death	Outbreak-associated cases
<i>Campylobacter</i> spp.	7,208 	1,524	25	19
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>6,694</b>	<b>1,971</b> 	<b>48</b> 	<b>631</b> 
STEC	1,824	441	7	27
<i>Shigella</i> spp.	1,534	524	3	145
<i>Yersinia</i> spp.	455	119	5	0

Logan C. Ray , et al., *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.*, 2021;  
CDC, FSIS, FDA, FoodNet, 2022

# 沙門氏菌 ( *Salmonella* )

➤分類：革蘭氏陰性桿菌，腸桿菌科，具有超過2,600種血清型

➤傳播途徑：

- 污染的食物或水 ( 特別是生肉、蛋類、乳製品 )
- 動物或人類糞便污染

➤常見症狀：

- 腸胃炎、腹瀉、發燒、噁心嘔吐

➤重要血清型：

- *S. enteritidis*, *S. typhimurium*

➤預防方法：

- 食物煮熟、避免交叉污染、良好衛生習慣



Source: FDA

# 李斯特菌 ( *Listeria monocytogenes* )

➤分類：革蘭氏陽性桿菌，可在低溫生長（冷藏食品中存活）

➤傳播途徑：

- 食用未煮熟的肉品、未殺菌的乳製品、生菜沙拉等

➤易感族群：

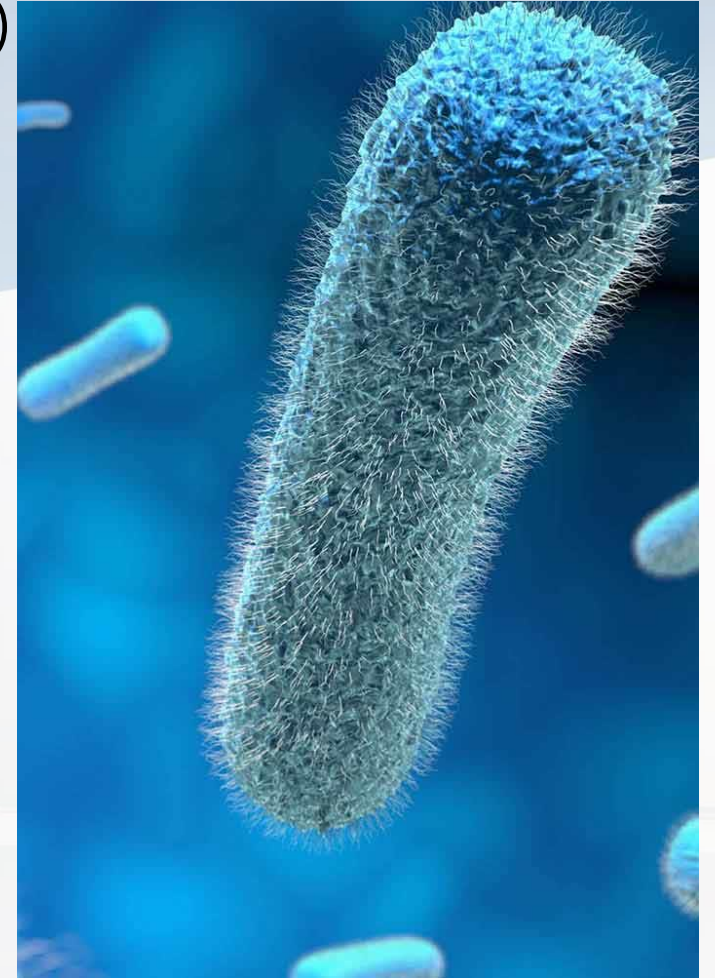
- 孕婦、新生兒、老年人、免疫低下者

➤症狀：

- 腸胃不適、敗血症、腦膜炎
- 孕婦感染可能導致流產或胎兒感染

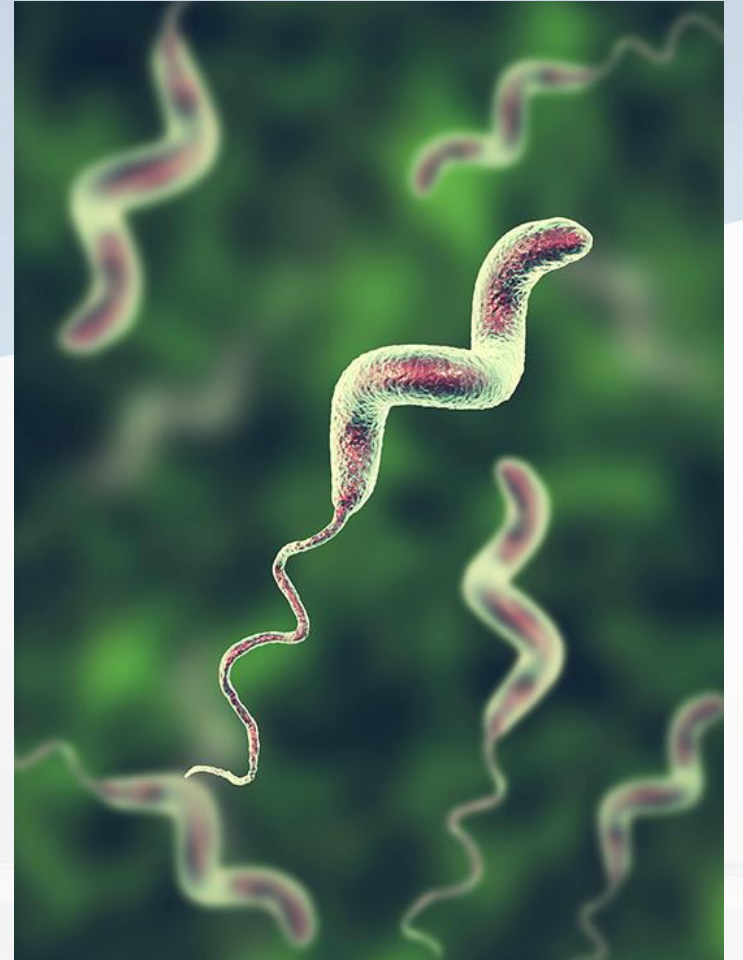
➤防治重點：

- 冷藏食品的衛生控管、避免生食高風險食品



# 彎曲菌 ( *Campylobacter* )

- 分類：革蘭氏陰性螺旋狀桿菌，微需氧菌
- 主要菌種：*C. jejuni*、*C. coli*
- 傳播途徑：
  - 食用未煮熟的雞肉、受污染的水源或生乳
- 症狀：
  - 發燒、腹瀉（有時含血）、腹痛
  - 少數病例可能引發格林–巴利症候群（Guillain-Barré syndrome）
- 預防方式：
  - 肉品澈底加熱、飲用乾淨水源、食品處理衛生



Source:modernpoultry.media

# 多重抗藥Multi-Drug Resistant (MDR) 菌

- 人類和動物過度使用抗生素
- 抗藥性細菌透過用於糧食作物的肥料和水傳播
- 透過醫療系統以及食用受污染的作物和動物產品而傳播



# 多重抗藥Multi-Drug Resistant (MDR) 菌

- 每年超過280萬人死於多重抗藥性
- 超過3.5萬人因此死亡
- 耐多藥導致醫療保健問題
- 到2050年，死亡人數將超過1000萬人（比癌症更致命）



# 歐美抗生素限制規定

## 歐盟：

- 2006 - 禁止使用抗生素促進生長
- 2020 - 禁止養殖動物使用常規抗生素

## 美國：

- 2013年 - FDA產業指南第213號
- 逐步淘汰用於畜牧業之重要抗生素
- 停止使用促進動物生長之抗生素
- 在獸醫監督下使用



# 取代抗生素控制食媒性病原微生物方案

## ➤ Pro-commensal strategies

- 益生菌 ( Probiotics )
- 益生元 ( Prebiotics )
- 合生元 ( Synbiotics )



<https://en.wikipedia.org/wiki/Probiotic>

## ➤ 天然抗菌物質

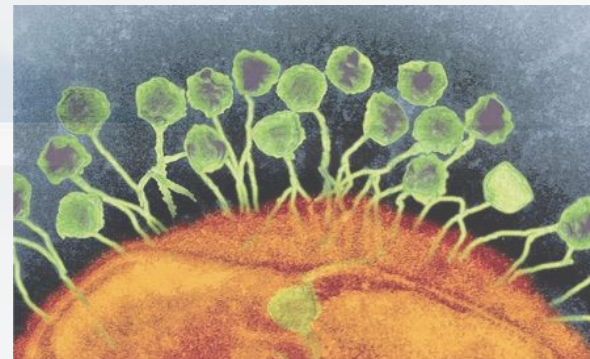
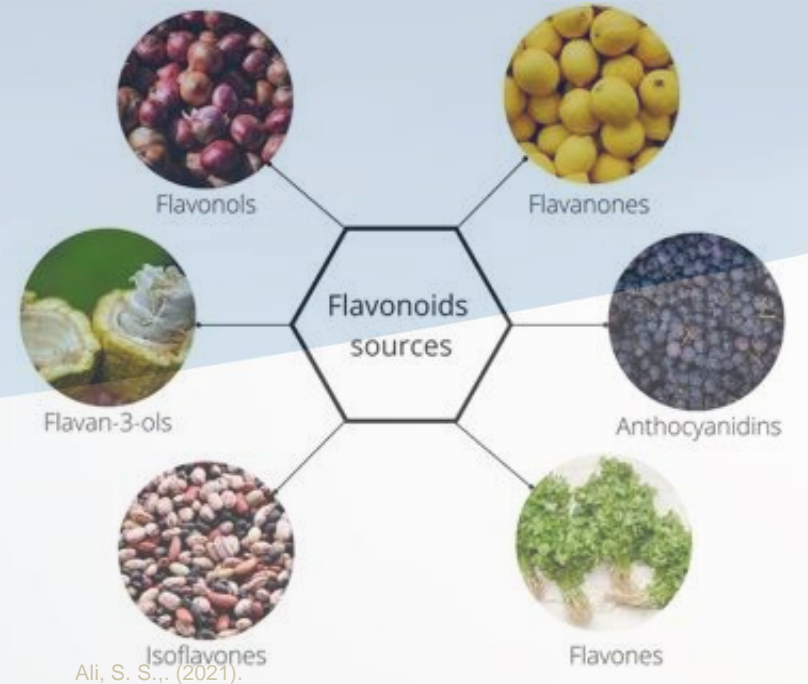
- 植生素 ( Phytobiotics )
- 黃酮類化合物 ( Flavonoids )
- 多酚類成分 ( Polyphenolic components )

## ➤ 精油 ( Essential oils )

## ➤ 疫苗 ( Vaccination )

## ➤ 噬菌體療法 ( Bacteriophage therapy )

## ➤ 噬菌體延生物療法 ( Phage-derived therapy )



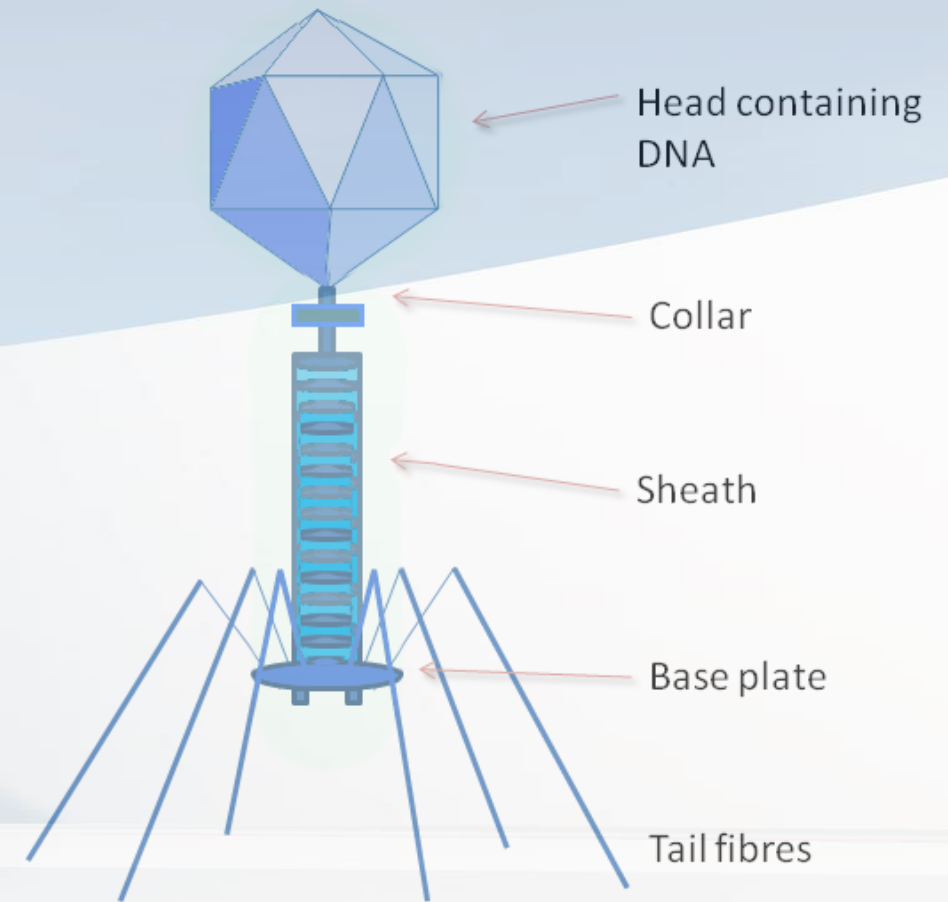
<https://www.science.org>



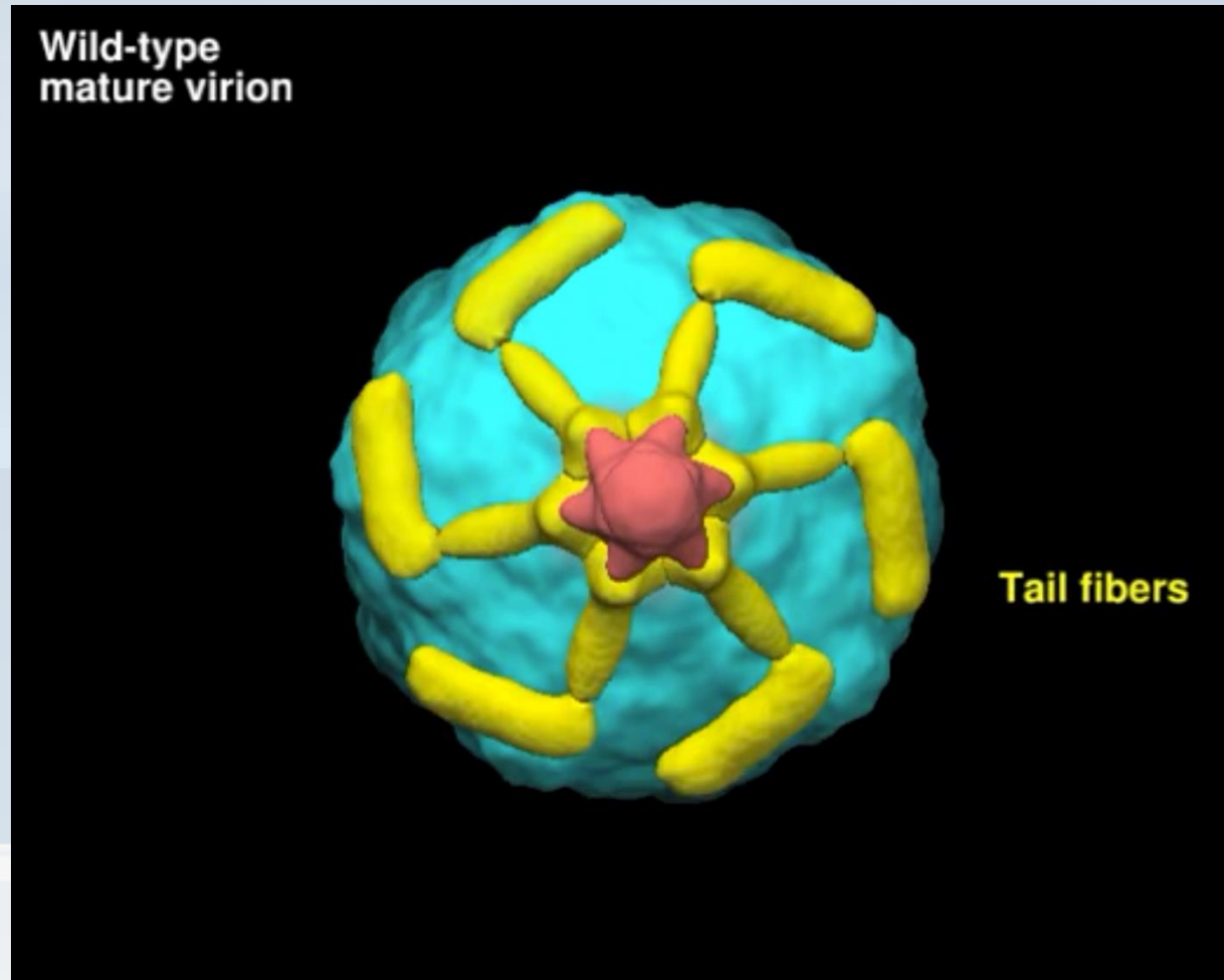
<https://covid19.gacnd.org/vaccine/>

# 噬菌體(Bacteriophage/Phage)簡介

- 噬菌體是病毒，但只感染細菌細胞
- **結構**：根據不同種類的噬菌體有所差異
  - 遺傳物質 ( DNA 或 RNA )
  - 蛋白質外殼 ( capsid )
  - 蛋白質尾部 ( 用於識別並附著在細菌細胞上 )
  - 有些噬菌體具有外膜或膜狀結構
- **噬菌體治療的主要優勢**：
  - 更安全 ( 只針對細菌 )
  - 宿主範圍狹窄 ( 只攻擊有害細菌 )
  - 無處不在 ( 可以在各處發現 )
  - 成本較低 ( 相比抗生素 )

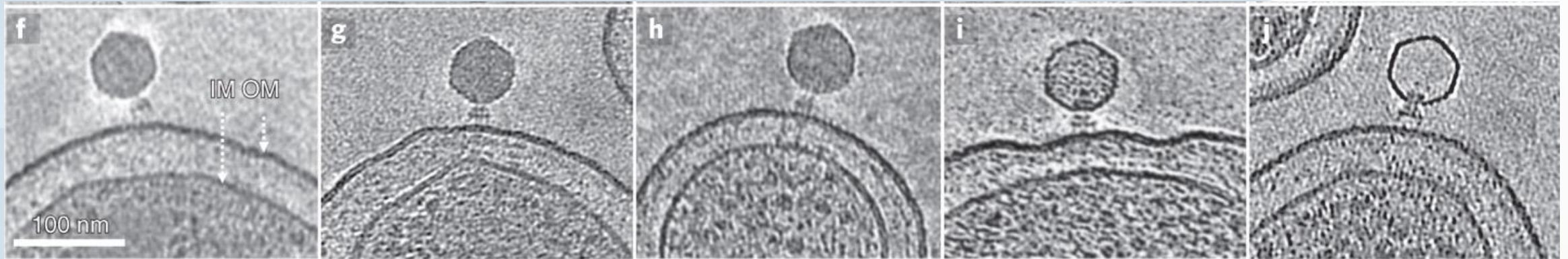


# 噬菌體感染細菌之機轉-1



Wang C, Tu J, Liu J, Molineux IJ. Structural dynamics of bacteriophage P22 infection initiation revealed by cryo-electron tomography. *Nat Microbiol.* 2019

# 噬菌體感染細菌之機轉-2



3 min  
Roll and attach a host cell

15 min  
Attach perpendicularly  
And Inject its DNA

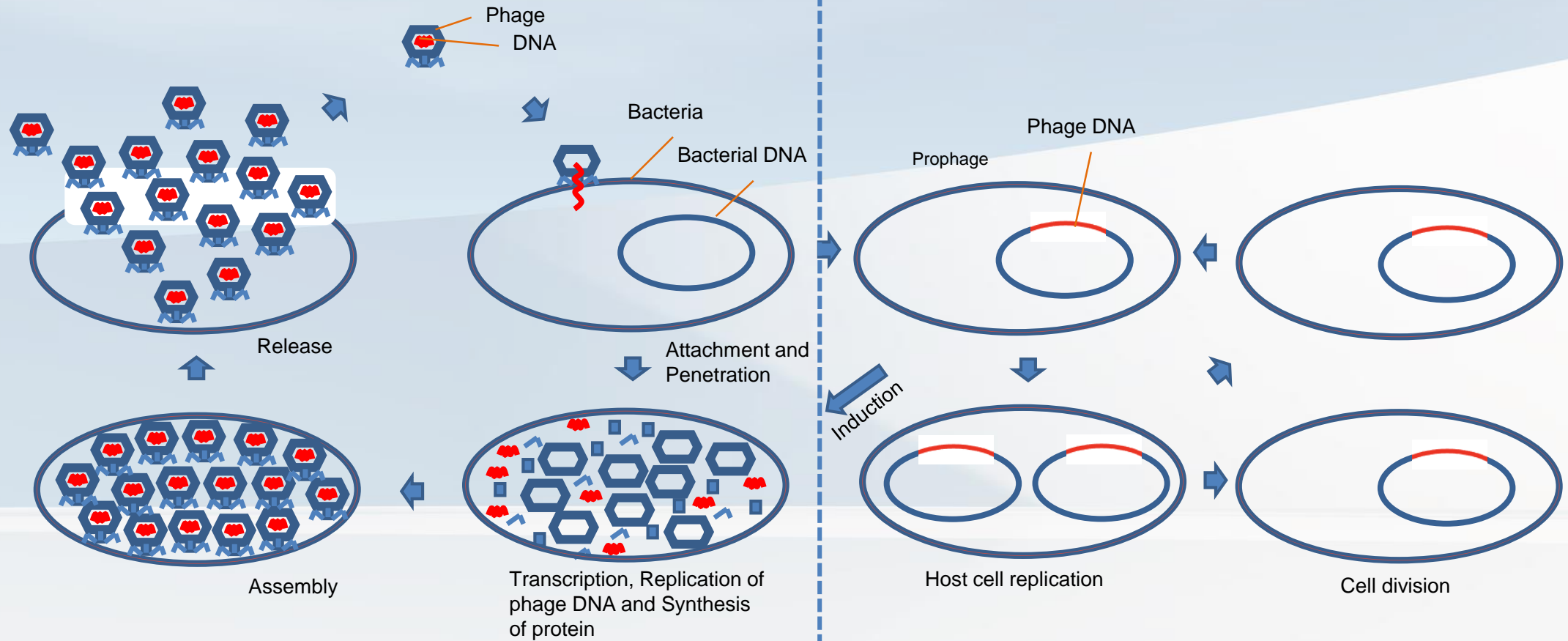
30 min  
Less genome  
in the its capsid

60 min  
An empty capsid

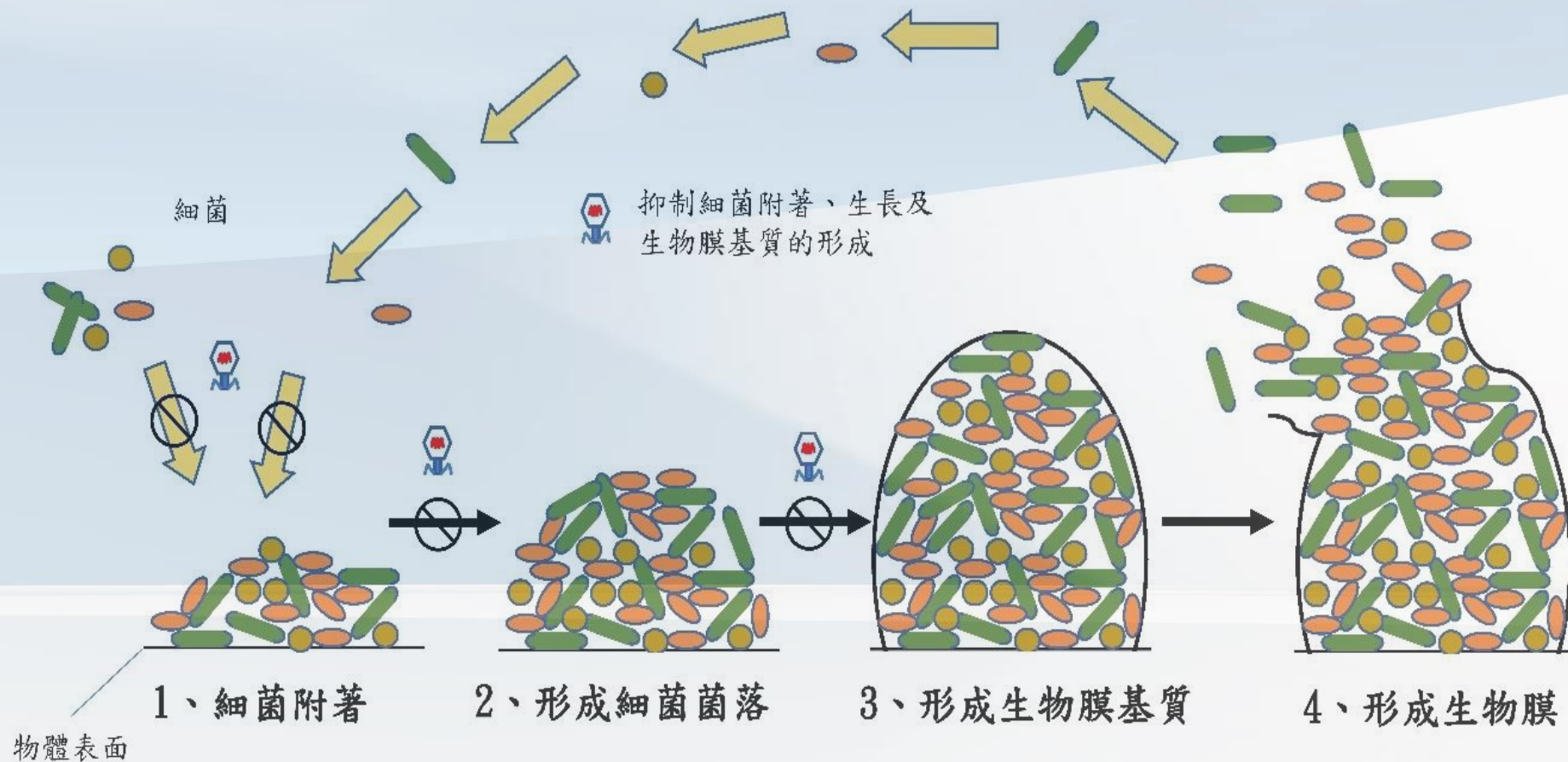
# 噬菌體感染細菌之機轉-2

## 溶解循環 ( Lytic cycle )

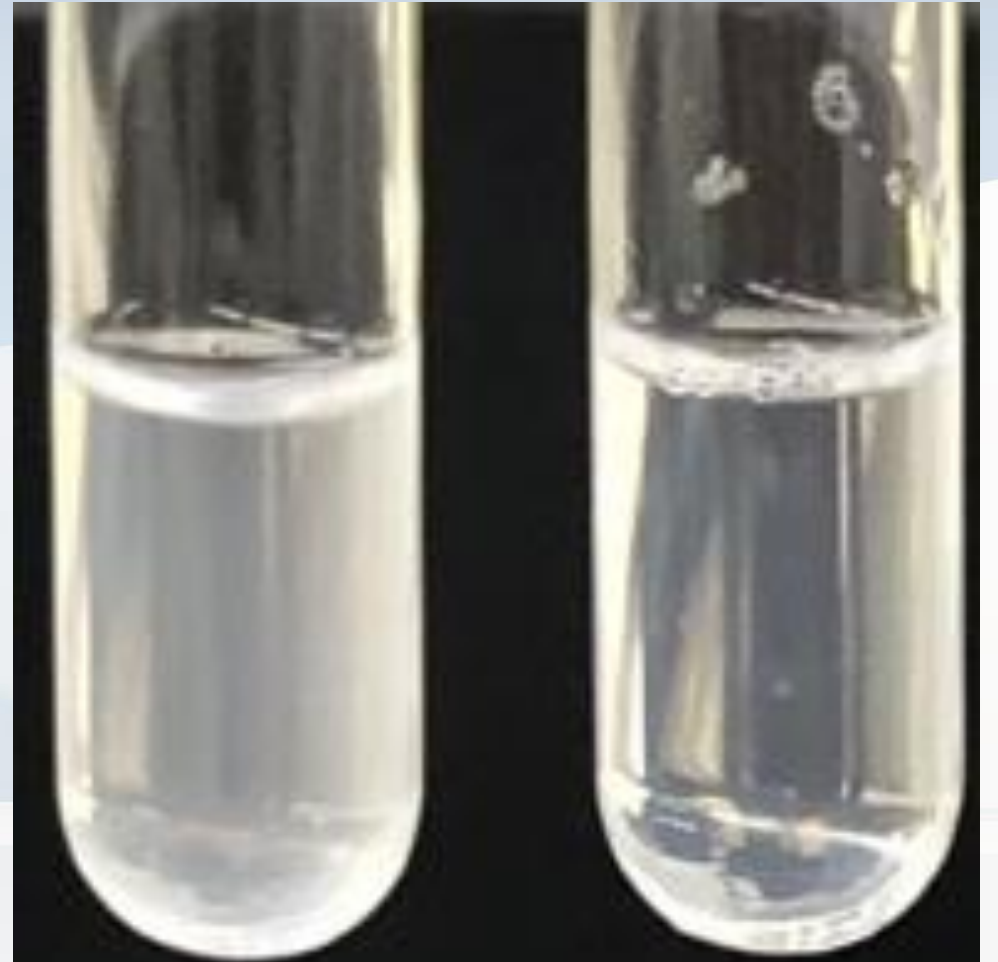
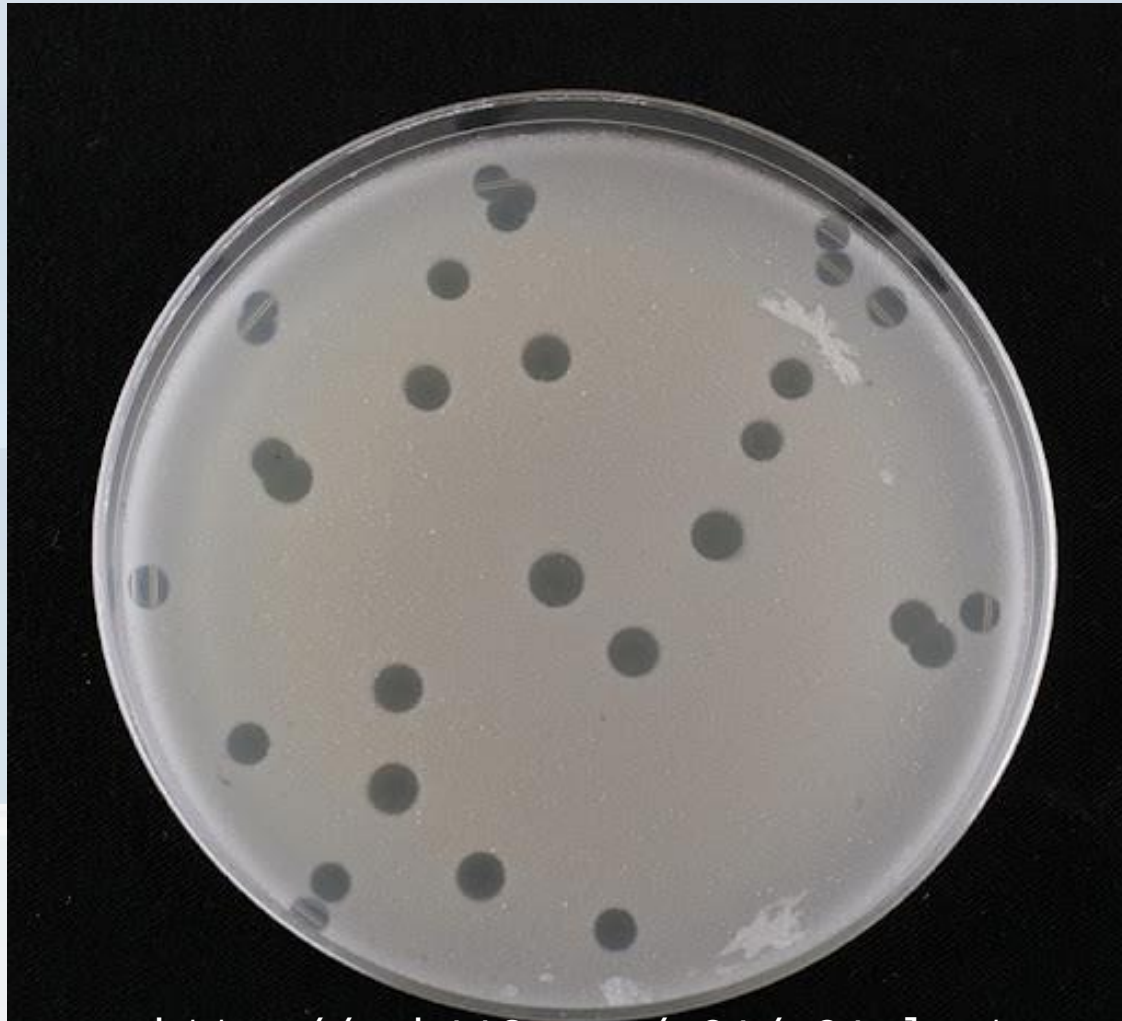
## 溶源循環 ( Lysogenic cycle )



# 噬菌體感染細菌之機轉-3



# 噬菌體的抑菌效果



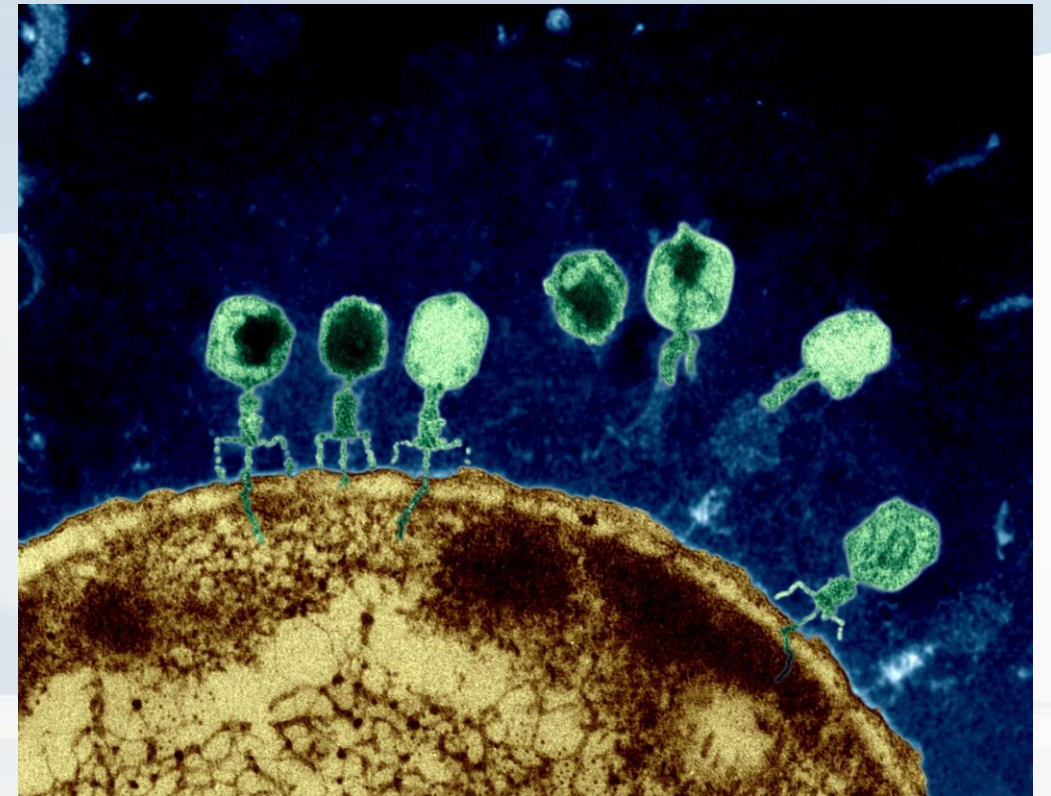
<http://mcb112.org/w01/w01-lecture.html>

# 噬菌體用於生物防治之優點

優點	
環境中大量存在	生物圈中所占最多數量，易於分離和利用。
高度專一性	高度特異性感染宿主，並僅消除目標細菌。
快速產生子代	與抗生素不同，噬菌體一旦感染目標細菌便具有繁殖能力。
廣泛之應用性	噬菌體的基因修飾能力與其結構靈活性、繁殖速率及安全性等特性，提供潛在之應用。
對自然微生物群無害	因其對宿主的高度特異性，天然微生物群不受其影響。
成本效益高	環境中的廣泛性與穩定性使其易於分離、純化和繁殖，耗費成本低。

# 噬菌體應用的挑戰

- 噬菌體抗性
- 細菌毒力及抗藥性基因傳播
- 宿主範圍狹窄
- 可應用之噬菌體數量
- 對腸道菌相的影響
- 宿主 / 動物細胞的免疫反應
- 法規審核與核准問題



# 細菌與噬菌體間的「軍備競賽」

➤ CRISPR系統 ( Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ) : 細菌的後天免疫系統

➤ 運作機制 :

- **感染記錄** : 細菌遭噬菌體感染後，會將部分噬菌體DNA剪下並整合到自身基因組中的CRISPR序列中
- **識別與防禦** : 當相同噬菌體再次入侵時，CRISPR會轉錄成crRNA，並與Cas9蛋白結合、識別並切斷噬菌體DNA，達成防禦作用



(<https://www.technologynetworks.com>)

# 內溶素 ( Endolysin)及穿孔蛋白 ( Holin)

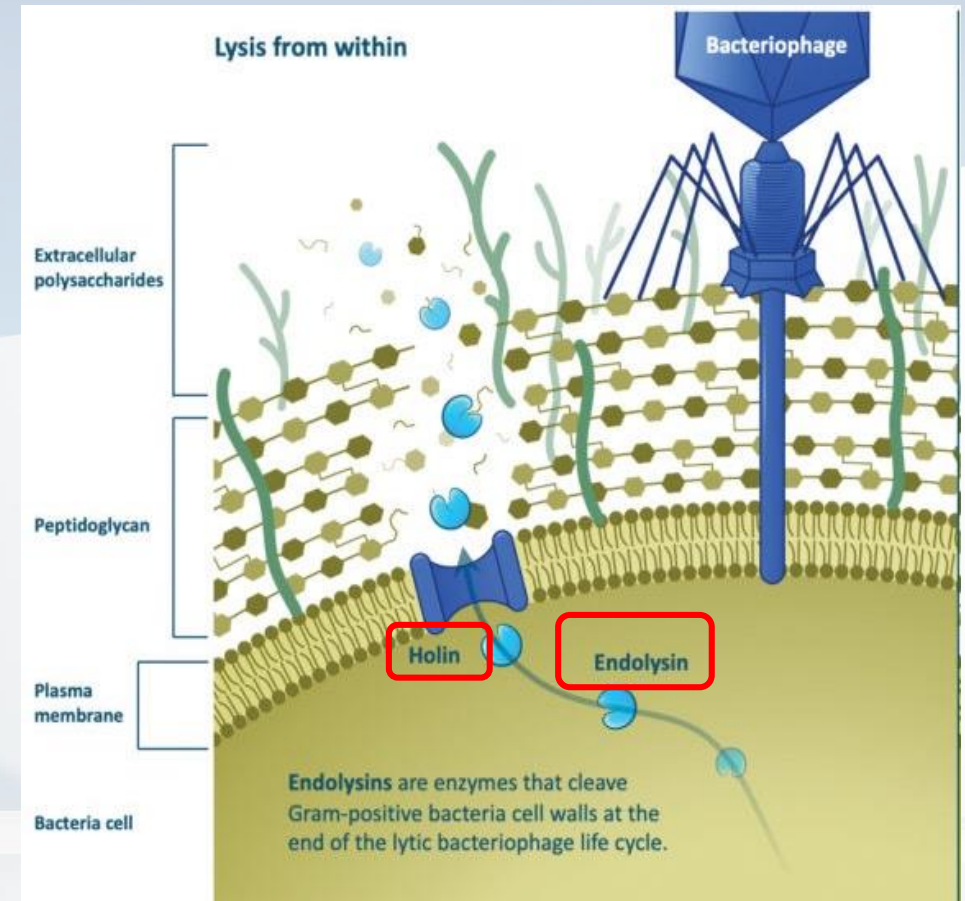
細胞裂解涉及的兩種主要酶：

➤ 內溶素 ( Endolysins ， 水解酶 ) ：

- 破壞肽聚糖結構
- 是一種有潛力的抗生素替代方案

➤ 穿孔蛋白 ( Holin ) ：

- 小型蛋白亞基在內膜上打洞
- 幫助內溶素釋放到細胞壁
- 決定病毒複製周期的結束時間

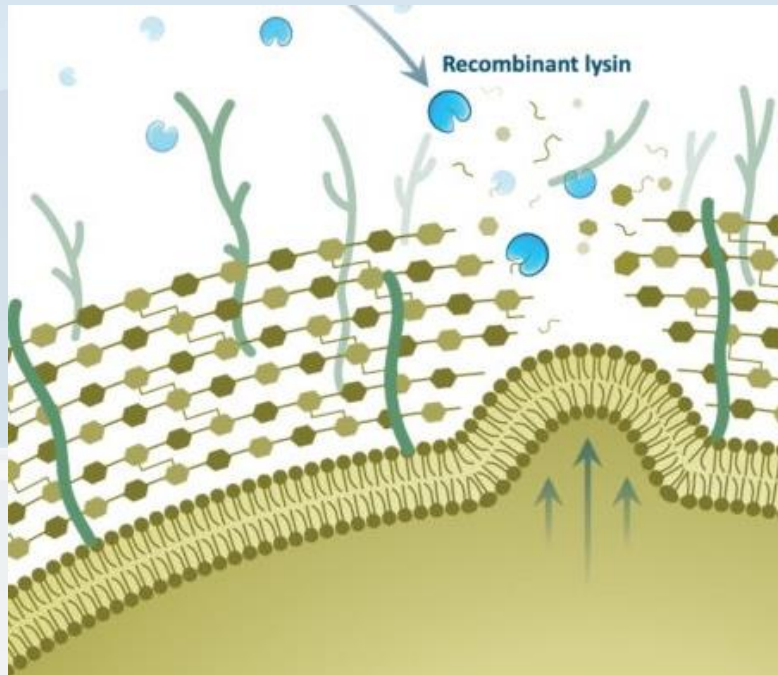


<https://www.genengnews.com>

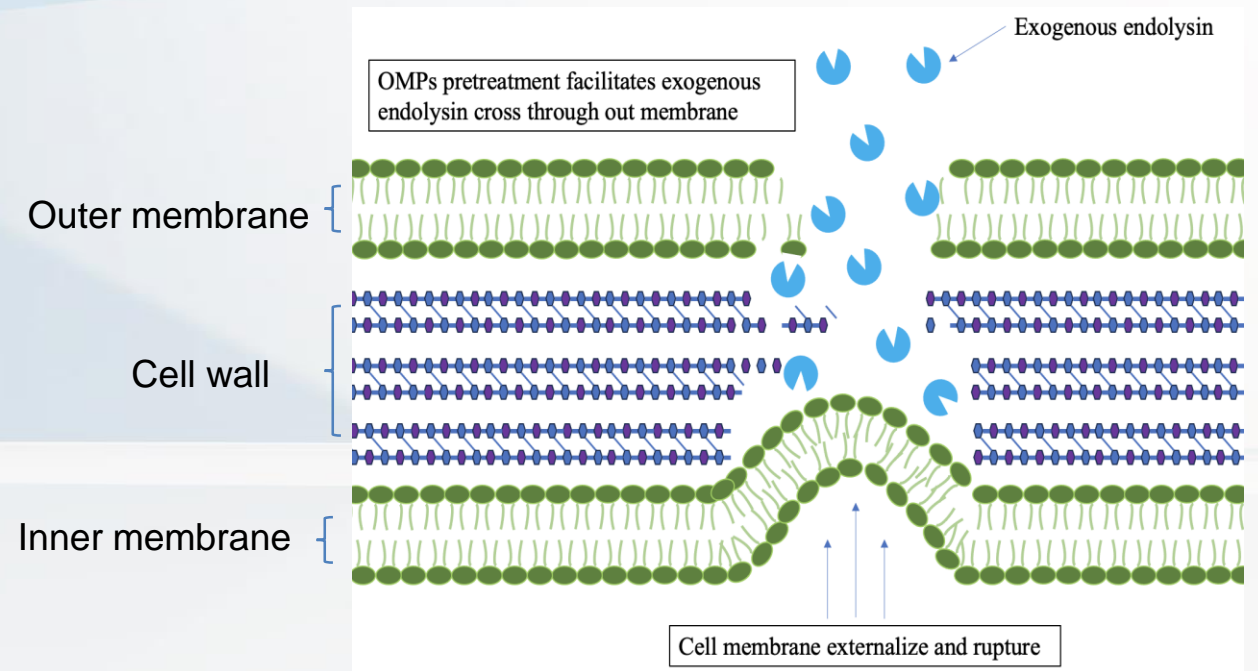
# 外源性內溶素的作用機制

- 革蘭氏陰性菌有外膜。
- 溶菌素無法從外部穿過外膜。
- 需要外膜通透劑，例如EDTA。

## Gram-Positive bacteria



## Gram-Negative bacteria

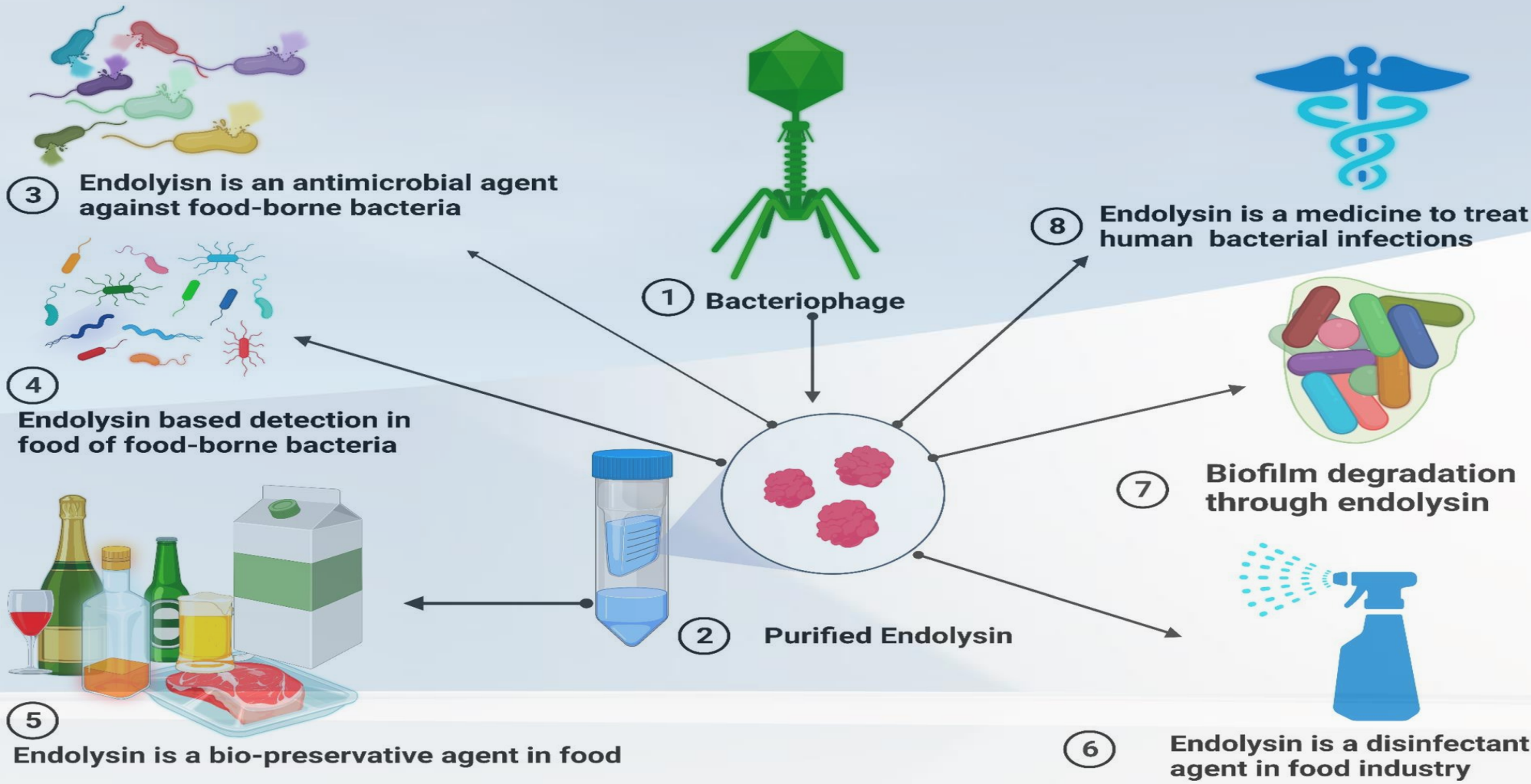


# 噬菌體衍生相關技術之應用

- **增強裂解活性與宿主範圍**：利用基因工程或篩選方式提升噬菌體的殺菌能力與感染範圍。
- **噬菌體雞尾酒療法**：混合多種噬菌體以對抗不同菌株，避免抗性產生。
- **噬菌體與 CRISPR 結合應用**：將CRISPR-Cas系統導入噬菌體，專一清除特定抗藥菌。
- **噬菌體與抗生素協同作用**：合併使用可提高殺菌效果，降低抗藥性菌的存活率。
- **基因工程噬菌體**：透過基因改造提升治療效果、目標專一性與安全性。
- **噬菌體水解酶**：如內溶素，可直接裂解細菌細胞壁，作為抗菌劑使用。

Products name	Target pathogens	Approval Year	Applications
<b>Salmonella Enteritidis Phage Preparation (Strain SP8)</b>	Salmonella Enteritidis	2024	Ground chicken.
<b>Applied Phage Vegetable S2</b>	Salmonella enterica	2023	Fresh and processed fruit and vegetables.
<b>Applied Phage Meat S2</b>	Salmonella enterica	2023	Ground and whole red meat and poultry, including whole carcasses, primals, sub-primals, trimmings, and organs.
<b>CampyShield™</b>	Campylobacter jejuni	2021	Raw red meat, including whole carcasses, primals, sub-primals, cuts, trimmings, and organs; and raw poultry, including carcasses and parts.
<b>GPI Biotech VAM-S</b>	Salmonella enterica	2020	Poultry, eggs, red meat, fruits, vegetables, fish, and shellfish.
<b>EcoShield™</b>	Escherichia coli	2019	Ground and whole meat and poultry, including whole carcasses, primals and sub-primals, trimmings and organs; RTE meats and poultry; fresh and processed fruits; fresh and processed vegetables; dairy products (including cheese); and fish and other seafood.
<b>ECLYPSE-STEC™</b>	Escherichia coli	2019	Poultry, red meats, fruits, vegetables, eggs, fish, and shellfish.
<b>Phage Guard E™</b>	Escherichia coli O157	2018	Beef carcasses, sub-primals, beef cuts and trimmings intended for ground beef.
<b>SalmoPro®</b>	Salmonella enterica	2018	Poultry, red meats, fruits, vegetables, eggs, fish, and shellfish.
<b>FinaLyse™</b>	Escherichia coli	2018	Beef carcasses.
<b>ShigaShield™ (ShiActive™)</b>	Shigella spp.	2017	Dairy products, RTE meats, fresh and processed vegetables, fresh and processed fruits, fish and shellfish.
<b>SalmoPro®</b>	Salmonella enterica	2016	As an antimicrobial to control Salmonella in food.
<b>ListShield™</b>	Listeria monocytogenes	2014	Dairy products, fresh and processed vegetables, fresh and processed fruits, and fish and shellfish.
<b>Salmonex™</b>	Salmonella enterica	2013	Pork and poultry products; beef; vegetables; and fresh and saltwater seafood (excluding Siluriformes (catfish)).
<b>SalmoFresh™</b>	Salmonella enterica	2013	RTE and raw poultry products; RTE and raw red meat carcasses, sub-primals, and trimmings; fish; shellfish; and fresh and processed fruits and vegetables.
<b>Listex™ P100</b>	Listeria innocua	2007	Meat and poultry products.
<b>Listex™ P100</b>	Listeria innocua	2006	Cheeses are normally aged and ripened.

# 噬菌體衍生之溶菌素為有效之制菌劑



# 內容素產品

產品	目標菌
HY-133	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tonabacase (LSVT-1701)	<i>Staphylococcus aureus</i>
CF-301	<i>Staphylococcus aureus</i>
N-Rephasin® SAL200	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Staphefekt SA.100</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CF-301	<i>Staphylococcus aureus</i>
N-Rephasin® SAL200	<i>Staphylococcus aureus</i>
P128	<i>Staphylococcus aureus</i>



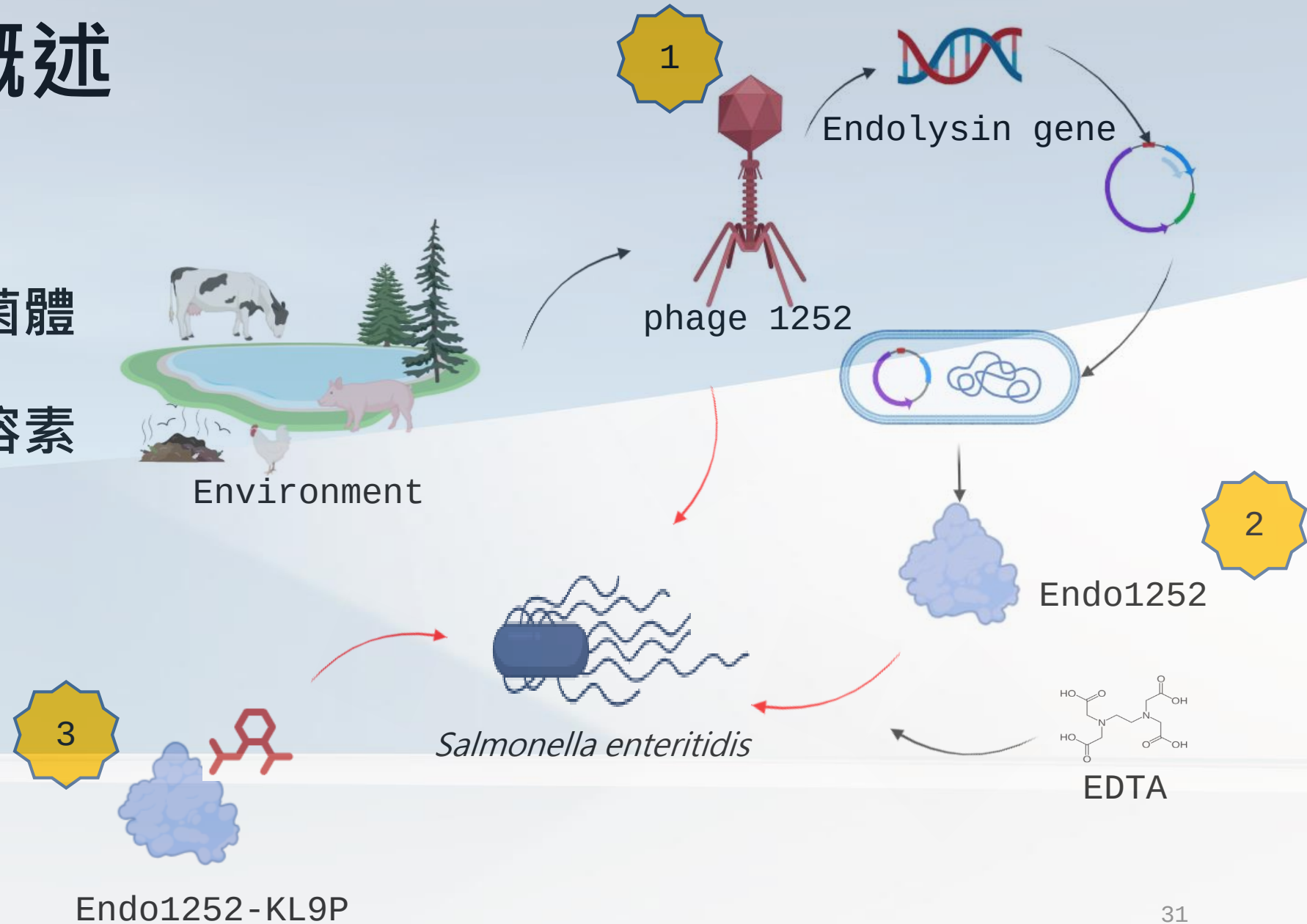
# STAPHEFEKT™

- **用途**：用於治療皮膚上金黃色葡萄球菌感染
- **形式**：外用藥膏或凝膠
- **特點**：僅針對特定菌株，不破壞有益菌叢
- **狀態**：歐洲已上市，屬於化妝品類



# 研究論文概述

1. 搜尋環境中的噬菌體
2. 生產噬菌體之內溶素
3. 合成內溶素



# 論文研究1總結:

- Phage-1252 對多種腸道沙門氏菌血清型均具有溶菌活性。
- 基因組由 244,421 bp 的雙股 DNA 組成，屬於Myoviridae科。
- 噬菌斑(plaque)直徑範圍為 0.5 毫米至 2.5 毫米。
- 6 小時後可抑制 *Salmonella* Enteritidis 的生長。
- 潛伏期：約 40 分鐘；上升期：約 30 分鐘；爆發量：56 PFU/細胞。
- 在 4°C 至 55°C 之間保持活性。

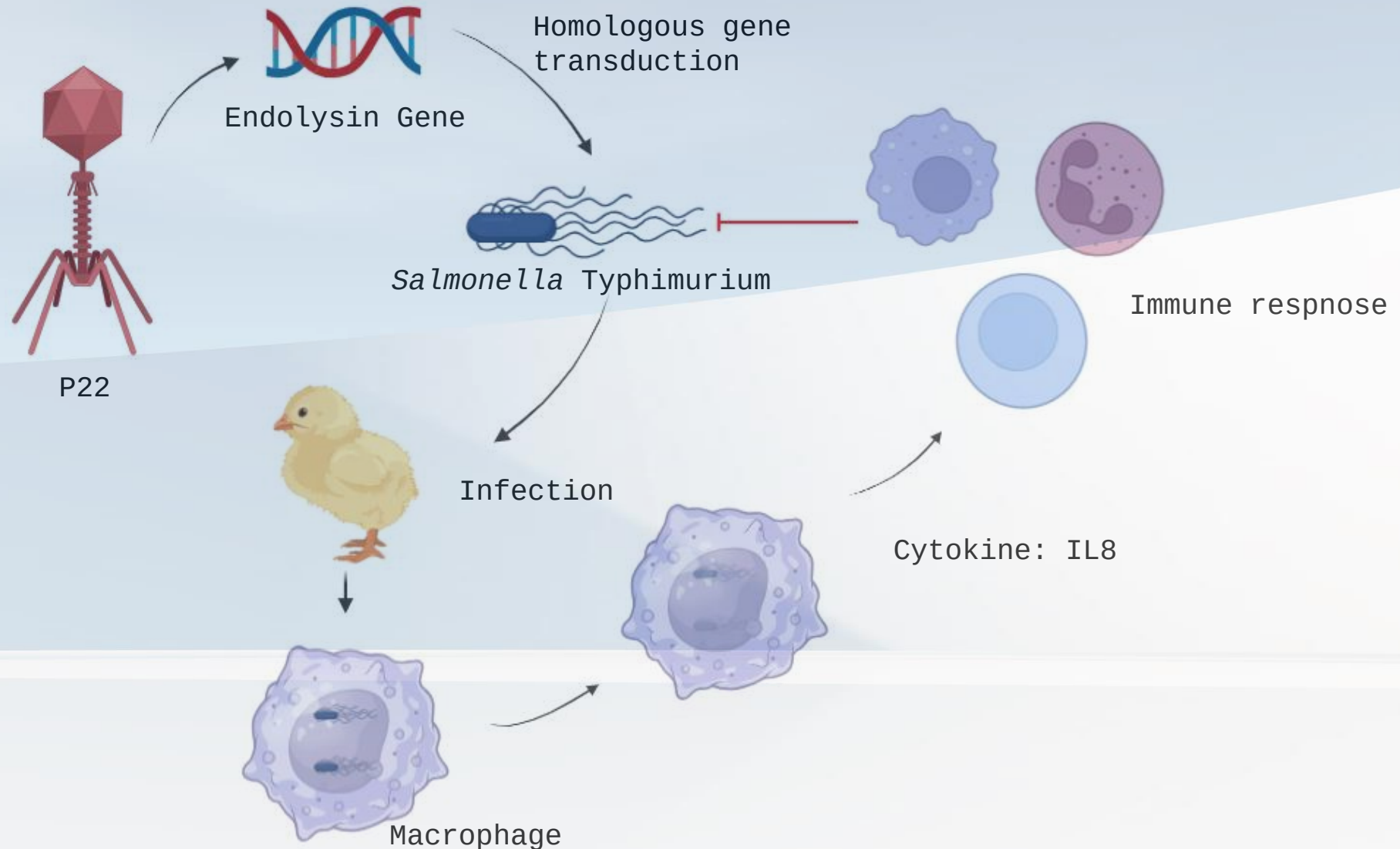
# 論文研究2總結:

- 內溶素蛋白ENDO-1252 對 *Salmonella* Enteritidis 及 *Salmonella* Typhimurium 均表現出顯著性的溶解活性。
- ENDO-1252 的最佳活性條件為 25°C 和 pH 7.0。
- 與 0.1 mM EDTA 結合使用，作用 6 小時，可使 *Salmonella* Enteritidis 減少 92.87%。

# 論文研究3總結:

- 融合內溶素蛋白ENDO-1252/KL9P無需使用外膜通透劑 ( EDTA 對不同血清型之沙門氏菌表現出顯著的溶菌活性。 。
- 免疫螢光分析證實融合蛋白直接與細菌細胞壁結合，並使其細胞變形並溶解。

# 實驗室目前研究主題-內溶素轉殖沙門氏菌疫苗



# 論文發表

- 1. A Highly Effective Bacteriophage-1252 to Control Multiple Serovars of *Salmonella enterica*.** *Foods*, 12(4), 797. <https://doi.org/10.3390/foods12040797> - (Aim1)
- 2. The effectiveness of endolysin ENDO-1252 from *Salmonella* bacteriophage-1252 against nontyphoidal *Salmonella enterica*.** *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnae051> - (Aim-2)
- 3. Enhanced Antibacterial Activity of Fusion Endolysin ENDO-1252/KL9P Against *Salmonella enterica* serovars – (Aim-3)** (under peer review)
- 4. Limitation of the lytic effect of bacteriophages on *Salmonella* and other enteric bacterial pathogens and approaches to overcome – (Literature review)** (under peer review)

# 結語

- 噬菌體（Bacteriophage）是一種專一性感染細菌的病毒，因其對特定細菌具有高度專一性，近年被廣泛應用於食媒性病原微生物的控制與預防。
- 隨著抗生素抗藥性問題日益嚴重，噬菌體被視為一種安全且具潛力的替代方案。
- 其可直接應用於食品、肉品表面、環境或包裝材料中，有效抑制如沙門氏菌、大腸桿菌O157:H7與李斯特菌等常見食源性致病菌，噬菌體於美國之食品產業之應用已具備高度環保與可接受性，期待未來能將成為維護國人食肉安全有效防制措施。

# 致謝

## ➤ 口試委員:

- Dr. Andrew Broadbent
- Dr. Mostafa Ghanem
- Dr. Abani Pradhan
- Dr. Cheng-I Wei
- Dr. Debabrata Biswas  
(指導老師)

## ➤ 實驗室成員:

- Anna Phan
- Kanchan Thapa
- Dita Julianingsih, MS
- Zabdiel Alvarado-Martínez, Ph.D.
- Zajeba Tabashsum, Ph.D.
- Arpita Aditya, Ph.D.

## ➤ 大學部實習生:

- |                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| • Aditi Mohapatra | • Christa Canagarajah |
| • Muhammad Hashmi | • Sarika Kapadia      |
| • Kayla Bleich    | • Katherine Hshieh    |
| • George Sellers  | • Saloni Manskey      |
| • Aaron Scriba    | • Anna Phung          |



農業部

MINISTRY OF AGRICULTURE



農業部  
動植物防疫檢疫署

Animal and Plant Health Inspection Agency  
Ministry of Agriculture



DEPARTMENT OF  
ANIMAL & AVIAN  
SCIENCES



謝謝聆聽！

