

疫情報導

- 155 高雄地區進口水產品腸炎弧菌調查研究
- 166 1998/1999流行性感冒病毒分離情形之簡介
- 171 國內、外疫情
- 179 台閩地區法定傳染病及報告傳染病

高雄地區進口水產品腸炎弧菌調查研究

摘要

腸炎弧菌在臺灣、日本及沿海地區是主要腸道病原菌之一。在民國 86 年腸炎弧菌發生 106 件爆發性流行，患者數高達 4,318 人，應加強衛生教育和食品衛生並管理進口水產品，以免致病菌株從國外流入。本研究自八十六年七月至八十七年四月間，選自高雄機場進口水產品檢體共 686 件，檢驗腸炎弧菌及產毒基因。腸炎弧菌總檢出率為 45.9%，其中以泰國進口海蠋 81.3% 最高，其次為泰國進口活蝦 75.8% 及香港進口海蠋 71.1%，不同區域來源，統計上均具有顯著意義($p<0.01$)。統計分析顯示甲殼類的檢體腸炎弧菌檢出率 49.4%，顯著高於非甲殼類 37.4%；至於以月份計，各月份之檢出率為 36.7% 至 51.1%，無顯著差異。以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)偵測水產品檢體之腸炎弧菌之熱穩定性溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH) 及類似 TDH 溶血素(thermostable direct related hemolysin, TRH)之毒素基因，實驗結果顯示 187 件水產品檢體之腸炎弧菌 *tdh* 及 *trh* 均呈陰性。雖然本次調查研究中產毒基因皆呈陰性，但在文獻中發現 Kanagawa-phenomenon 陰性之菌株，在動物實驗中仍可能會產生細胞毒性、致使老鼠死亡及誘導兔子迴腸管之積蓄，而進口水產品腸炎弧菌檢出率頗高，故仍須慎密防範；預防腸炎弧菌食品中毒，水產品正確烹煮方式及冷藏方法是非常重要的。

前　　言

腸炎弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是國內引起食品中毒的主要致病菌之一，從民國 81 年至 86 年臺灣地區食品中毒案件之病因物質分類表中腸炎弧菌爆發流行件數居首位；由 81 年 20 件的案件竄升至 86 年 106 件⁽¹⁾。此菌亦是造成近年來學校營養午餐或外燴食物中毒元兇之一^(2,3)；東南亞入境旅客中發生腸胃炎的病例也常檢驗出此菌^(4,5)。此種致病菌造成爆發性流行之主要原因係生熟食交互污染、生鮮食品未加熱完全、個人衛生不良以及保溫不當所致^(2,6)。

近年來由於國民所得日益提高、生活水準之提升及飲食習慣改變，從國外進口之水產品日益增多，如：82 年進口 39,562 批 159,097,183 公斤、83 年進口 43,516 批 168,588,283 公斤、84 年進口 48,774 批 187,389,864 公斤、85 年進口 51,989 批 184,960,913 公斤⁽⁷⁾及 86 年進口 52,177 批 271,364,261 公斤⁽⁸⁾，其中鮮活水產品分別由台北檢疫分所進口 31,768,194 公斤、高雄第二檢疫分所進口 5,881,856 公斤，其餘為冷凍水產品；進口水產品之數量龐大，疫情監視有其必要性。儘管如此，然國內並未曾對進口水產品中腸炎弧菌盛行率進行相關研究，為瞭解進口水產品腸炎弧菌存活及分佈情形，本研究依目前由進口量最多的國別、品目分類加以探討，對腸炎弧菌存在進口水產品之生態提出初步的描述性資料。根據流行病學的調查發現由臨床分離出之腸炎弧菌產生熱穩定溶血素 thermostable direct hemolysin (TDH) 佔了 88~96 %，而只有 1~2 % 之環境分離菌株會產生 TDH^(9,10,11)。TDH 被認為與腸炎弧菌的致病性有極密切之關係，此可能是造成腹瀉之原因。本研究以聚合酶鏈反應偵測水產品檢體之腸炎弧菌之熱穩定性溶血基因(tdh)⁽¹²⁾及類似 TDH 溶血素基因(trh)⁽¹³⁾。並探討腸炎弧菌不同月份、季節在進口水產品存在的情形，以期能對腸炎弧菌檢疫工作及防治政策之參考。

材料與方法

一、檢體來源

自民國 86 年 7 月至 87 年 4 月，由高雄機場進口之鮮活水產品共計

採得檢體 686 件，包括由越南進口的沙蟹 126 件、龍蝦 59 件、蝦姑 95 件、鳳螺 106 件，香港進口活海蠋 114 件，泰國進口活海蠋 32 件及沙蝦 62 件，印尼進口鮮魚 92 件。

二、培養基

增菌培養基採用 3% 鹼性蛋白胨培養液(3% alkaline peptone-salt-broth pH 8.2-8.4，簡稱 APS)，選擇性分離培養基用硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖洋菜培養基(Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts Sucrose Agar，簡稱 TCBS)。用三糖鐵洋菜培養基(Triple Sugar Iron Agar，簡稱 TSI)當作是篩選性培養基。以 3% NaCl Nutrient agar 當作純化培養基。

三、培養方法

沙蟹、龍蝦、蝦姑、活海蠋等甲殼類每批檢體採 1~3 隻，鳳螺每批檢體採 20~30 個、沙蝦每批檢體採 15~20 隻，鮮魚每批檢體採一隻、部位為鰓。將檢體置入無菌袋加入含 1% NaCl 之蒸餾水中，均勻混合成二倍稀釋液，再放入 3% APS 作增菌培養，37 °C 下增菌培養 6~7 小時。取一接種環接種培養液，劃在 TCBS 培養基上，37 °C 隔夜培養。

四、菌株鑑定

TCBS 上呈圓形、直徑在 2~3mm 且中心點帶有綠或藍色菌落可能是腸炎弧菌，挑出可疑之單一菌落接種於含有 1% NaCl 之篩選性培養基(TSI)，於 37 °C 隔夜培養，挑取底部為黃色、斜面為紅色、無產氣且無產生硫化氫者，接種在 3% NaCl Nutrient agar，37 °C 培養 12~18 小時。最後用 API 20E (bioMerieux, France) 進行菌種鑑定工作。

五、以 PCR 檢測腸炎弧菌之 TDH 與 TRH 之產毒基因

1. 寡核苷酸引子(Oligonucleotide primers)

依據已發表之腸炎弧菌產生 TDH 及 TRH 之產毒基因(tdh, trh)序列^(12,13)合成相關之 PCR 引子，說明如下：

tdh 5'-GTACCGATATTTGCAAA-3' 和 5'-ATGTTGAAGCTGTACTTGA-3'

trh 5'-CTCTACTTGCTTCAGT -3' 和 5'-AATATTATGGAGTTCAT- 3' 。

DNA 片段預測產物長度分別為 382 和 460 bp 。

同。在本研究過程中，在 API 20E 套組判定時發現套組中有些 Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside(ONPG)反應呈微弱黃色，但重覆操作之下，ONPG 反應呈無色，可能是先前 Kit 問題。另外腸炎弧菌 ONPG 生化反應[5%是陽性⁽¹⁹⁾]，判定上可能與 *V. vulnificus* 混淆。據 Massad 和 Oliver 在 1987 年之文獻中，區別腸炎弧菌及創傷弧菌可用 Cellubiose-Polymysin B-Colostin(CPC) Agar 於 40 °C 時，有不錯之判別效果⁽²⁰⁾。故將來應用於水產品檢驗時，CPC Agar 可當作這二種菌之再確認用。

五、毒素基因 PCR 測定

隨機選取 187 株腸炎弧菌，同時進行 *tdh* 與 *trh* 檢測，發現 *tdh* 及 *trh* 均呈陰性，另以臨床菌株二件為模板進行 PCR 時，*tdh* 均呈陽性、*trh* 呈陰性。文獻中指出 urea hydrolysis positive 菌株可當作預測毒力因子(*trh*-possessing)之標幟(marker)⁽²¹⁾。1995 年 Suthienkul 等人從臨床檢體 489 件中檢出 urea hydrolysis positive 共 37 件，佔 7.5%，且均具 *trh*⁽²¹⁾。本調查中 urea hydrolysis positive 僅 3 件，佔 0.95%，且均不具 *trh*。由此看來進口水產品檢體 urea hydrolysis positive 之菌株及是否具有 *trh* 均較臨床菌株少。

結論與建議

- 一般而言，在檢驗室收到的臨床檢體，大都是急性期病人檢體，故在偵測是否有腸炎弧菌時，直接將檢體接種在 TCBS 就可獲致很好結果。文獻中環境檢體培養時間並無一致性，如增菌培養基 APS、glucose-salt-teepol broth 於 35~37 °C 之下 16~18 小時⁽¹⁶⁾，增菌培養基 APW 37 °C 之下 7~8 小時⁽¹⁷⁾，增菌培養基 APW 37 °C 之下 15~18 小時⁽²²⁾。本研究實施時，選擇增菌培養時間 16~18 小時，事後統計時發現檢出率太低 7/60 (12%)；在經不斷修正培養時間後發現，6~8 小時對水產品之腸炎弧菌增菌時間之生長情形最好。因此在檢測致病性病原菌時，控制適當的溫度及時間非常重要。
- 臺灣及日本 1973~87 腸炎弧菌爆發性流行均佔第一，原因菌分別為 57% 及 32%⁽²²⁾。據流行病學統計臨床分離之腸炎弧菌熱穩定溶血素佔 88~96%，只有 1~2% 環境菌株會產生熱穩定溶血素^(23,24)，本研究利用 PCR 偵測 187 件

水產品發現，腸炎弧菌熱穩定溶血素基因 *tdh* 及類似 TDH 溶血素基因 *trh* 均為陰性。雖然很多文獻中說明 Kanagawa Positive 菌株常造成腸胃炎；1992 及 1993 年，Wong 等人証實部份 Kanagawa Negative 菌株在中國大頰鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell)部份菌株會造成 cytotoxic 與 cytotoxic 毒性，及對老鼠產生致命性後果(Mouse lethality)^(17,25)。1991 年，Honda 等人在 Kanagawa Negative 菌株發現第三型溶血素(稱 Vp-TDH / I)，並提出 Vp-TDH / I 會誘導兔子迴腸管液體積蓄，此可能解釋為腸炎弧菌在 Kanagawa Negative 菌株產生腸胃炎之原因⁽²⁶⁾。本次研究腸炎弧菌檢出率高達 45.9%，*tdh* 及 *trh* 雖然均呈陰性，但不能完全排除對致病的可能性，對進口水產品的衛生不能不重視。

3. 1997 年腸炎弧菌之國內爆發流行其血清型大都是 K6^(2,3)，更令人覺得好奇的是自 1997 年由高雄入境旅客因腸胃炎，在高雄第一檢疫分所被檢出腸炎弧菌菌株共計 12 件，其中血清型 K6 高達 9 件(75%)。是否東南亞地區之腸炎弧菌爆發流行屬於同一來源仍待進一步探討。
4. 本次研究雖然腸炎弧菌檢出率 45.9%，毒素基因均為陰性；然腸炎弧菌在本國既非法定亦非報告傳染病，即使進口水產品檢驗出具產毒性菌株也沒有相當檢疫規定可以施以罰則或禁止禁口，而且腸炎弧菌散佈於各海域及水產品中，如何預防食品中毒需要消費者、業者與政府之間，努力相互配合。對於腸炎弧菌引起食品中毒預防方法，包括隨時保持食物、器具、冰箱、個人及環境清潔；迅速處理及調理生鮮食物，確實做好生、熟食之分隔及衛生，避免交互感染；因溫度會降低腸炎弧菌生長故食品儘量保持於冰箱中，並於食用前應加熱(60 °C、15 分鐘可殺死腸炎弧菌)。在此藉由本篇研究引發各界重視食品中毒問題，深切瞭解食品中毒發生原因及預防措施，掌握食品衛生原則，以確保飲食安全。

撰稿者：陳美珠^(1,4)、黃顯宗⁽²⁾、李敏西⁽¹⁾、劉定萍⁽³⁾、李鏡梯⁽⁴⁾、吳聰能⁽⁵⁾

1. 行政院衛生署預防醫學研究所流行病學訓練班
2. 東吳大學微生物學系
3. 行政院衛生署檢疫總所

表二 高雄地區進口水產品甲殼類與非甲殼類檢出率、95% CI 與 RR

類 別	樣品數	陽性數	檢出率 %	95% C.I.	RR
甲 殼 ^a	488	241	49.4	1.1~1.8	1.42*
非甲殼 ^b	198	74	37.4	---	1.00

檢體採自 86 年 7 月至 87 年 4 月；95% CI : 95% Confidence interval

RR : risk ratio ; * P<0.01

^a: 龍蝦、蝦姑、海蟳、活蝦、沙蟹

^b: 鮮魚和鳳螺

表三 進口水產品腸炎弧菌月份別檢出率、95% CI 與 RR

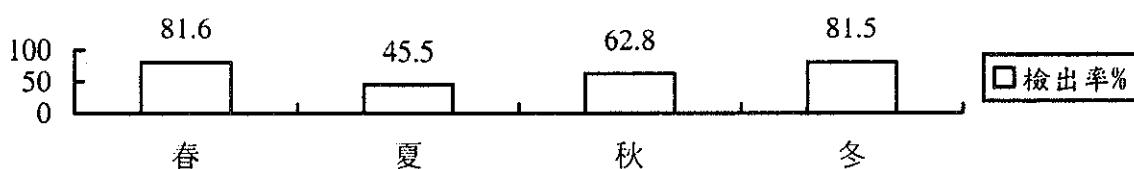
年	月	樣品數	陽性數	檢出率%	95% CI	RR
86	7	67	30	44.9	1.0~1.1	1.00
	8	61	29	47.5	1.0~1.1	1.01
	9	66	27	40.9	0.9~1.0	0.98
	10	64	32	50.0	1.0~1.1	1.02
	11	80	39	48.8	1.0~1.1	1.02
	12	79	29	36.7	0.9~1.0	0.95
	87	1	45	53.6	1.0~1.1	1.04
	2	94	48	51.1	1.0~1.1	1.03
	3	23	10	43.5	1.0	1.00
	4	68	26	38.2	0.9~1.0	0.92
合 計		686	315	45.9	---	1.00

檢體採自 86 年 7 月至 87 年 4 月；95% CI : 95% Confidence interval

RR : risk ratio

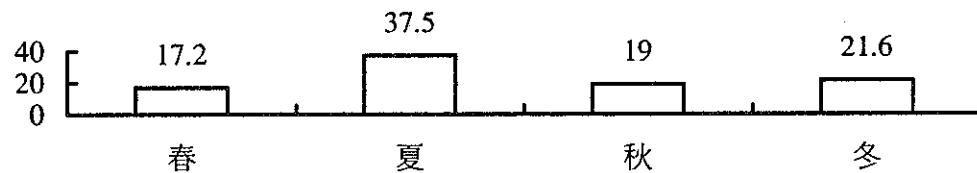
圖一 高雄地區進口水產品腸炎弧菌不同季節之檢出率

◆ 海 蟲

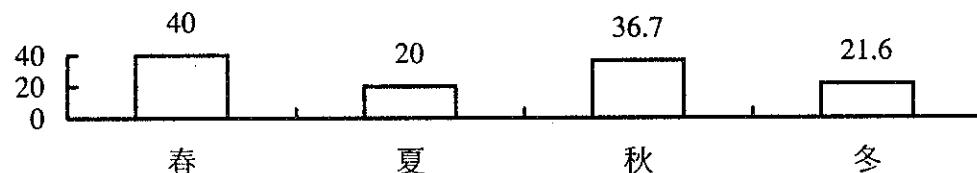


圖一 高雄地區進口水產品腸炎弧菌不同季節之檢出率(續)

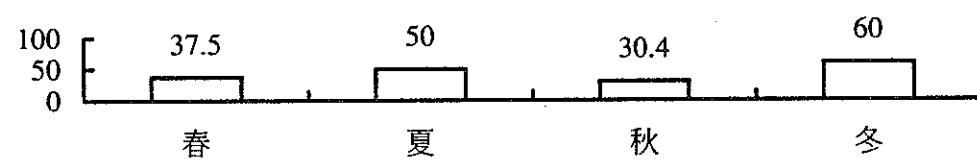
◆ 蝦 姑



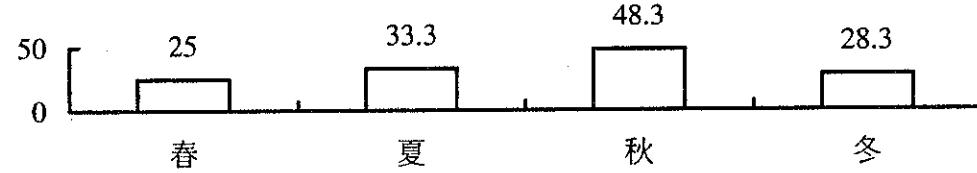
◆ 鮮 魚



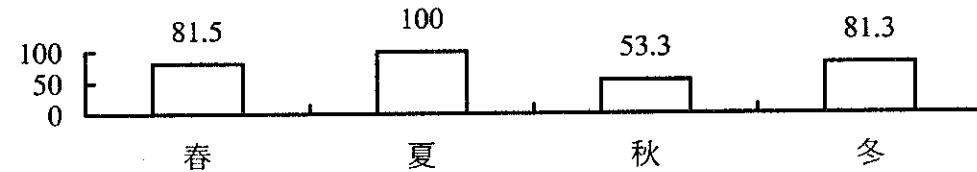
◆ 龍 蝦



◆ 沙 蟹



◆ 蝦



◆ 凤 螺

