計畫編號：MOHW103-CDC-C-114-000803

衛生福利部疾病管制署 103 年委託科技研究計畫

計畫名稱：畜牧場之食媒性病原之監測與流行病學分析

103 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國立屏東科技大學　獸醫學系

計畫主持人：廖明輝

研究人員：吳弘毅、施玟玲、魯懿萍

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

目　　錄

頁 碼

摘要----------3~4

壹、前言----------5~9

貳、材料與方法---------- 10~17

叁、結果---------- 18~20

肆、討論---------- 20~23

伍、結論與建議----------23

陸、參考文獻---------- 24~26

柒、圖表---------- 27~31

圖一、檢測豬隻糞便地區分佈分析圖---------- 27

表一、豬隻糞便食媒性病原檢測分析結果---------- 28

表二、豬隻糞便食媒性病原依行政區域檢測分析結果---------- 29

表三、豬隻糞便食媒性病原依不同季節檢測分析結果---------- 30

表四、豬隻糞便食媒性病原依不同年齡檢測分析結果----------31

摘要

由食物媒介病原引起的臨床症狀範圍廣泛，常造成困惑。目前已知食媒性病原有 31 種，其中與國人健康比較有重要的病原包括病毒方面 E 型肝炎病毒(HEV)、輪狀病毒(Rotavirus)和諾羅病毒(Norovirus)。細菌方面包括沙氏桿菌(Salmonella spp)、彎形菌(Campylobacter spp)、李斯特菌(Listeria monocytogenes)、腸出血性大腸桿菌(Enterohamorrhagic Escherichia coli)和梭菌(Clostridium perfingens, Clostridium difficile)。寄生蟲方面有弓蟲症(Toxoplasmosis)、隱胞子蟲症(Cryptosporidiosis)、阿米巴原蟲症(Amoebiasis)和梨形蟲症(Giardiasis)等。上述病原在動物亦造成從不顯性感染到引起嚴重的臨床症狀，造成畜牧場嚴重的經濟損失。本研究目的主要為調查上述病原在本省養豬場的盛行率。自 2014 年 1 月至 12 月，從全省各地養豬場以逢機採樣方式採集豬隻糞便，進行細菌分離、培養、鑑定和抽取病原核酸以聚合酶連鎖反應檢測。至目前為止，共採集 1200 件糞便檢體，檢測結果輪狀病毒有 106 件呈陽性、諾羅病毒有 6 件呈陽性、E 型肝炎病毒有 1 件呈陽性、腸出血性大腸桿菌有 22 件呈陽性、沙氏桿菌有 10 件呈陽性、彎形菌有 1 件呈陽性、梨形鞭毛蟲有 19 件呈陽性、隱胞子蟲有 16 件呈陽性。此結果可供相關防疫單位對上述食媒性病原防治和公共衛生上的參考依據。

關鍵字：食媒性病原、監測、畜牧場、流行病學

Abstract

The food-borne pathogens cause clinical diseases widely and always confusing. Up to now, we recognized 31 pathogens transmitted by food. Among them, Hepatitis E virus, Rotavirus and Norovirus, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Listeria monocytogenes*, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*, toxoplasmosis, cryptosporidiosis, amoebiasis and giardiasis are highly related to human health. These pathogens affected animals and caused subclinical infections to serious clinical diseases resulted in financial losses of livestock farms. The aim of this research is to investigate the prevalence rate of pathogens in pig farms in Taiwan. Random sampling of pig stools from January to December in 2014 were collected, then bacteria isolation, identification as well as polymerase chain reaction were performed for identification of pathagens. Until now, 1200 samples were collected and examined, 106 samples revealed Rotavirus positive, 6 are Norovirus positive, one is HEV positive, 22 are Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection, 10 are *Salmonella spp* infection, one is *Campylobacter spp* infection, 19 are giardiasis infection and 16 are cryptosporidiosis infection. The current results could provide the useful information for disease prevention and treatment agency in epidemic, public health and food-borne pathogens prevention.

Keywords: Food-borne pathogens, Surveillance, Livestock farm, Epidemiology

壹、前言

由食物媒介病原引起的臨床症狀範圍廣泛，常造成困惑，如典型的食物中毒症狀為急性胃腸道障礙，如腹瀉、嘔吐或兩者兼具，並伴隨相關症狀如腹痛與不適。然而，腸道致病原也可引起急性且威脅生命的腸道外疾病，如呼吸道、腎臟和生產前後等疾病。此等症狀可獨立出現，或隨典型胃腸道症狀而發生。而由食物媒介病原引起的慢性病如關節病和自體免疫甲狀腺病亦有增加的趨勢。

急性胃腸炎為全球性重要的健康衛生問題，大約有上百種疾病是透過食物為媒介所造成，包括細菌、病毒、寄生蟲、毒素及 prions 等。依據美國 CDC 於 2011 年估計全年食媒性疾病,每 6 個美國人中就有 1 個人(即 4 千 8 百萬人)感染發病，其中 128,000 人住院，3,000 人死亡。分析其病原發現前五名，依序是 Norovirus(58%)、*Salmonella* nontyphoidal(11%)、*Clostridium perfringens*(10%) 、 *Campylobacter* spp.(9%) 、 *Staphylococcus aureus*(3%)。而在住院的病原前五名，依序是 *Salmonella* nontyphoidal(35%) 、 Norovirus(26%) 、 *Campylobacter* spp.(15%) 、 *Toxoplasma gondii* (8%)、*E. coli*(STEC) O157 (4%)。造成死亡的病原前五名，依序是 *Salmonella* nontyphoidal(28%)、*Toxoplasma gondii*(24%)、*Listeria Monocytogenes*(19%)、Norovirus(11%)、*Campylobacter* spp.(6%)

(12) 。在韓國常見食媒性疾病由細菌感染引起的其排序為 *Salmonella* spp (20.7%)、*Vibrio* (17.4%)、*Staphylococcus* (9.7%)、Pathogenic *E.coli* (2.4%)，在日本常見食媒性疾病由細菌感染引起的其排序為 *Vibrio*(32.2%)、*Staphylococcus* (15.9%)、*Salmonella* (14.2%)、Pathogenic *E.coli*(3.0%)(14)。

國內有關食物媒介疾病於 1977 有報告統計在 1986-1995 年間共有 852 病例，由細菌引起的爆發疾病有 555 例(65%)，分析其病原發現前六名，依序是 *Vibrio parahaemolyticus*(35.5%)、*Staphylococcus aureus*(30.5%)、*Bacillus cereus*(18.7%)、*Escherichia coli*(6.5%)、*Salmonella* spp(1.8%)、*Clostridium botulinum*(1.4%)(17)。於 2005 亦有報告統計在 1995-2001 年間共有 1171 病例，在台灣北部地區由細菌引起的爆發疾病有 735 例(62.8%)，分析其病原發現前三名，依序是 *Vibrio parahaemolyticus*(86%)、*Staphylococcus aureus*(7.6%)、*Salmonella* spp(4.9%)(22)。

目前已知食媒性病原有 31 種之多。引起食因性疾病之已知感染原中病毒性約佔 79%，細菌性只佔 14%左右，而引起嬰幼兒急性腸胃炎的病毒又以輪狀病毒（*Rotavirus A*）排名第一。在美國及日本流行病學調查中，輪狀病毒、杯狀病毒及星狀病毒感染多發生於較冷的月份約 10 月至隔年 4

月，腺病毒及星狀病毒全年發生率無多大差異。年齡分布：輪狀病毒易感染嬰兒及小於 5 歲之幼兒；星狀病毒及腺病毒主要感染幼童，但成人及較大之孩童也可能感染。

最近的研究報告顯示，多起諾羅病毒引起的群聚胃腸炎與動物的諾羅病毒有關，並直接或間接的從廚師和食物檢體中檢驗出動物的諾羅病毒，而國外的研究報告在動物有關諾羅病毒及血清盛行率的研究顯示，諾羅病毒在全世界的動物身上傳播的頻率相當的高，由於諾羅病毒可在健康和有腹瀉症狀的動物身上檢驗出來，故動物也被認為是諾羅病毒重要的感染帶毒者。此外，動物除了提供諾羅病毒一個重要的帶毒者之外，有些動物如豬還扮演諾羅病毒基因重組演化的重要宿主。因為基因重組目前被認為是產生新滋生病毒的重要過程，且該新滋生的病毒有機會成為重要的人畜共通傳染病，因此不同物種間的病毒基因重組再度受到國際的重視，相關的流行病學研究也極需建立檢測病毒在抗原和基因方面的改變，以瞭解其盛行率和基因型別的變化及人畜共通流行的可行性，藉以提高其警覺性，防患於未來。我國疾病管制局雖有諾羅病毒盛行率的調查及社區爆發流行的報告，但在動物方面對諾羅病毒的相關研究調查報告確很稀少，而我國飼養的經濟動物和寵物數量相關龐大，急需在動物方面建立相關的流行病學資料，以便瞭解諾羅病毒此重要的人畜共通傳染病在人類和動物間

交互感染的重要性。

常見發生在國人的食媒性病原及其臨床症狀如下：沙氏桿菌：感染後 12-16 小時，引起腹瀉、嘔吐、發燒和倦怠。彎曲桿菌：進食 2-11 天後，先出現前驅發燒和倦怠，之後腹痛、水樣腹瀉。金黃色葡萄球菌：進食後 2-6 小時，發生嘔吐、腹瀉和腹痛，嚴重脫水導致虛脫。李斯特菌：引起新生兒腦炎、孕婦流產和敗血症。肉毒桿菌：進食後 24-72 小時發生，症狀為疲勞、乏力、眩暈、且影響中樞神經系統，以致語言困難、視覺障礙。腸道出血性大腸桿菌(Enterohaemorrhagic *E. coli*)：出血性結腸炎：症狀為劇疼隨之水樣腹瀉，初期噁心、嘔吐和腹脹。出血性尿毒症候群：一般始自腹瀉，隨後出現微小血管變性溶血性貧血，血小板減少症和急性腎臟衰竭，血栓性血小板減少性紫癜症。腸道致病性大腸桿菌(Enteropathogenic *E. coli*)：引起嬰兒腹瀉，症狀輕重不一。感染後 12-36 小時內出現引起水樣糞便，偶含黏液，常伴隨嘔吐和輕度發燒，症狀可能拖延，以致因脫水而導致酸中毒，可併發休克。產腸毒素性大腸桿菌(Enterotoxigenic)：呈水樣腹瀉，便中不帶血或黏液，常伴隨腹痛和嘔吐。HAV (Hepatitis A virus)： HAV 為主要之食物媒介性病毒症，多年來其感染遍及全球。常發生在未開發國家，而已開發國家已逐漸減少，但在貧窮鄉村的發生率仍高。常見症狀為疲勞、發燒、食慾喪失和噁心。HEV

(Hepatitis E virus)：典型症狀為腹瀉，或腹瀉和嘔吐，常伴隨倦怠、腹痛、發燒和噁心。

寄生蟲方面：

原蟲不能於食物中增殖，但蟲囊在食物中可維持長期的感染性，且感染劑量極低。隱胞子蟲症(Cryptosporidiosis)：隱胞子蟲係一絕對寄生物，分佈廣泛，無所不在，阿米巴病：症狀為下痢，糞便中含帶血黏液，疝痛和裡急內重，梨形蟲 (Giardia)：潛伏期約 1-3 週，症狀分為兩型，即急性腹瀉或慢性腹瀉而伴隨腸吸收不良。初期糞便常呈水樣，腹痛。脂漏，體重減輕。弓蟲：胎兒神經系統易受感染，自懷孕後至產期常出現腦鈣化，絨毛脈絡膜視網膜炎，水腦，小頭畸形，精神障礙，常導致死產。產後感染較不嚴重，典型症狀為輕度淋巴腺炎，可伴隨發燒(21)。

傳統上認為病毒都會有特定的感染宿主，但最近有許多文獻報告指出一些在人類分離出的病毒株，其基因序列會有動物病毒株來源，例如諾羅病毒(26)、輪狀病毒(9,25)、E 型肝炎病毒(7)、冠狀病毒(19)。這些病毒皆為 RNA 病毒，並且可以藉由糞便排出到環境中，引起人畜共通傳染病的可能性。

貳、材料與方法

1.豬場選定：

本研究依地理行政區分為北、中、南和東部 4 個地區豬場，針對不同年齡層(哺乳期、肥育期和種豬)的豬隻進行新鮮糞便檢體的採集各 10 個，共 120 個檢體，為瞭解上述病原的分布是否受到季節的影響，故每月各採集一次，總共 1440 個檢體。

2.檢體處理：

腹瀉病原檢驗通常必須採用新鮮糞便檢體，以低溫保存從採件處運送至實驗室。處理情形如下：將糞便檢體與 PBS 以 1:10（w/v, v/v）混合均勻，以無菌吸管吸取至已滅菌之離心管中，於 4℃，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，標示號碼及日期保存於冰箱中。

3.細菌培養、分離和鑑定：

將上述新鮮糞便檢體，依欲分離培養的細菌分別依其生長特性培養在適當的培養基中(15)。

沙氏桿菌培養：將上述新鮮糞便檢體，以無菌操作釣菌培養在 MacConkey agar 和 Bismuth sulfate agar，經 37℃ 24 小時，選擇無色透明菌落和黑色菌落純化，再用 API-20E 快速鑑定套組鑑定，確認後將沙氏桿菌保存在含 10%甘油的 nutrient broth，置於-70℃冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

腸出血性大腸桿菌培養：將上述新鮮糞便檢體先用 0.85% saline 混合以分離雜質，在取懸浮液接種置於 5 ml Tryptic Soy broth 培養基內，加 Vancomycin 和 Cefsulodin (1 ul/ml，濃度 50 ug/ul)，置於 37℃恆溫箱中振盪培養 4 小時，取菌液 100 ul 用 L 型彎曲玻璃棒在 Sorbitol MacConkey agar 和 Rainbow agar 上，置於 37℃恆溫箱中隔夜培養，挑選 Sorbitol MacConkey agar 乳白色和 Rainbow agar 紫黑色菌落純化。再用 API-20E 快速鑑定套組鑑定，確認後將腸出血性大腸桿菌保存在含 10%甘油的 nutrient broth，置於-70℃冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

產氣莢膜桿菌培養：將上述新鮮糞便檢體，以無菌操作釣菌培養在 EY-TSC(蛋黃胰化蛋白眎-亞硫酸鹽-環絲氨酸)後，置於 35℃厭氧培養 24 小時，選擇圓形、直徑約 1-2 mm、呈黃灰色且外圍有 2-4 mm 不透明環帶的菌落，接種於剛滅菌並急速冷卻之液態乙醇酸鹽培養基中，置於 35℃厭氧培養 24 小時純化。再做確定試驗如運動性、硝酸鹽還原、乳糖發酵、明膠液化、產芽孢、碳水化合物發酵等試驗，確認後將產氣莢膜桿菌保存在含 10%甘油的 EY-TSC，置於-70℃冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

李斯特菌培養：將上述新鮮糞便檢體，先以費氏培養液中，置於 35℃培養 24 小時，當有李斯特菌存在時，費氏培養液因栗糖苷的利用而產生黑變。再以無菌棉花棒沾取，塗怖於 MOX 培養基的 1/2 部份，再以接種環

進行二區劃線，置於 35℃培養 24-48 小時，典型李斯特菌的菌落周邊即呈現黑環區，再分別接種於 BHI agar、BHI broth 及斜面營養培養基，置於 18-25℃，16-18 小時培養，以備進行各生化特性測試用。確定試驗有傘狀運動、CAMP、觸酶、氧化酶、MR-VP 等等試驗。確認後將李斯特菌保存在含 10%甘油的 MOX broth，置於-70℃冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

彎曲桿菌的培養：將上述新鮮糞便檢體，先以增菌培養液培培養後，再取兩接種環的菌量置於 A-H-B 或 mCCDA 培養基上，再劃線分離，於 42℃微好氧培養 24-48 小時，每隔 24 小時觀察是否有菌落生長，選擇呈圓形至不規則狀，具有平滑的邊緣，呈濃厚的半透明白色狀生長至呈薄膜似透明狀擴散生長的菌落。再進行各生化特性測試(馬尿酸鹽水解、乙酸引朵酯水解、葡萄糖利用、TSI、抗生素抑制等等試驗)。確認後將彎曲桿菌保存在含 10%甘油的 BHI broth，置於-70℃冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

4.病原核酸的抽取和純化

稱約 20 克的糞便檢體，先用 1:1 的比例溶在無菌 phosphate-buffer saline (PBS)中，再以 vortex 混合均勻 1 分鐘後，用高速 (10,000 xg) 4℃離心 1 分鐘後，將上清液小心取出，再用高速 (10,000 xg) 4℃離心 7 分鐘後，取 200 uL 上清液用 QIAGEN DNA Mini kit 和 QIAGEN viral RNA Mini kit 抽取 DNA 和 RNA，抽取出來的 DNA 和 RNA 經分光光度計定量後，取 100 ng 進行 PCR 和 RT-PCR 反應，或置於 -70℃冰箱中備用。

5.病原特異性引子對的設計

針對不同病原已發表的引子對，來進行 PCR 和 RT-PCR。

輪狀病毒引子對：針對 VP6 gene 的序列為 BMJ41F 5’-GGCTTTAAAAATCTCATT-CA-3’; BMJ42R 5’-CCTCTAGTTGATTGAACATA-3’. (1)

諾羅病毒引子對：目前常見設計的區域有兩個: 一是針對 open reading frame 1 (ORF 1)的 polymerase gene 的保守區域所設計，主要由於 Polymerase gene 在所有物種中，均為病毒進行複製所必要的基因，故較少產生變異。二是針對 open reading frame 1 (ORF 1)的 polymerase gene 的 3’ end 和 5’ end 的 open reading frame 2(ORF 2)的 capsid gene 間的交界處所設計，由於諾羅病毒的全長病毒基因被解開之後，經過將不同物種間的全長病毒基因進行序列排列之後發現，相較於 polymerase gene 的保守區域，此交界處的基因序列更為保守。

針對特定物種 (如人類或豬隻)的諾羅病毒引子對 (porcine norovirus-specific primers)來檢測，其中又以檢測 genogroup II 的諾羅病毒為主，是因為 genogroup II 的諾羅病毒目前在全世界有分佈越來越廣泛的趨勢，且因為與人類的諾羅病毒基因非常相近，並有許多報告顯示，Genogroup II 的諾羅病毒會有不同物種間因同時感染而發生基因重組的現象，故目前針對特定物種 (如人類或豬隻)的諾羅病毒所設計的引子對，以檢測 genogroup II 的諾羅病毒為主。

本實驗室檢測是針對 RNA-dependent RNA polymerase gene 的序列

為

NoVF 5’-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3’;

NovR 5’-AC(A+T+G)AT(C+T)TCATCATCATCACCATA-3’. (20)

A 型肝炎病毒引子對：針對 VP1-2A junction region 的序列為

HAV-F 5’-GGTTTCTATTCAGATTGCAAATTA-3’;

HAV-R 5’-AGTAAAAACTCCAGCATCCATTTC-3’ (13)

E 型肝炎病毒引子對：針對 ORF-2 gene, 序列為

3158N 5’-GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT-3’;

3159N 5’-AGCCGACGAAATCAATTCT- CTC-3’ (11)

沙氏桿菌引子對：針對 16-23S rRNA gene 的序列為

ITSF 5’-TGCGGCTCACCTCCTT-3’;

ITSR 5’-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC-3’. (6)

腸出血性大腸桿菌引子對：針對 VT1 gene 的序列為

VTF 5’-ACGTTACAGCGTGTTGCRGGGATC-3’;

VTR 5’-TTGCCACAGACTGCGTCAGTR- AGG-3’. (18)

彎曲桿菌引子對：針對 23S rRNA gene 的序列為

THERM1 5’-ATTCCAATACCAACATTAGT-3’;

THERM4 5’-CTTCGCTAATGCTAACCC-3’. (8)

李斯特菌引子對： 針對 hlyA gene 的序列為

GO 5’-GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG-3’;

DO 5’-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3’ (4)

梭狀桿菌引子對：Clostridium difficile 的序列為

NK104 5’-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC-3’;

NK105 5’-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3’ (2)

Clostridium perfringens 的序列為

Cpbeta2F 5’-CAAGCAATTGGGGGAGTTTA-3’;

Cpbeta2R 5’-GCAGAATCAGGATTTTGACCA-3’. (24)

弓蟲引子對：序列為

Tox4:5’- CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3’

Tox5:5’-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3’ (3)

隱胞子蟲引子對：針對 18S rRNA gene. 第一次 PCR 序列為 (5’-TTCTAGAGCTAAATACATGCG-3’; 5’-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3’), 第二次 PCR 序列為

(5’-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3’;5’-CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA-3’)(27)

阿米巴原蟲引子對：序列為

EntaF 5’-ATGCACGAGAGCGAAAGCAT-3’; EhR 5’-GATCTAGAAACAATGCTTCTCT-3’;EdR5’-CACCACTTACTATCCC TACC-3’; EmR 5’-TGACCGGAGCCAGAGACAT-3’ (10)

梨形原蟲引子對：針對 β-giardin gene, 第一次 PCR 序列為

(G7 5’-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3,

G759 5’-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3’),

第二次 PCR 序列為 (G376 5’-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3;

G759 5’-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3’) (5)

6.聚合酶連鎖反應 (PCR)

主要是對細菌和寄生蟲 DNA 之檢測，取一無菌的 0.2 mL PCR 專用微量離心管，先加入上述抽取的 DNA，在加入 dNTPs、引子對、*Taq* 酵素和 10 倍緩衝溶液，接著加入無菌蒸餾水至 25 uL，充分混合後，置於 PCR 反應器上，設定反應溫度和時間及回數，反應結束後，取出以電泳分析產物。

7.反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

主要是對 RNA 病毒之檢測，取一無菌的 0.2 mL PCR 專用微量離心管，先加入上述抽取的 RNA，在加入 dNTPs、引子對、反轉錄酵素、*Taq* 酵素和 10 倍緩衝溶液，接著加入無菌蒸餾水至 25 uL，充分混合後，置於 PCR 反應器上，設定反應溫度和時間及回數，反應結束後，取出以電泳分析產物。

8.PCR 產物之選殖和定序

將 PCR 的產物利用 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)純化後，再放至 pCR2.1-TOPO(T/A) or PCR XL cloning kit (Invitrogen)，所得到的 clone 隨機選取 5 個，利用 BigDye Terminator Cycle and 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)的方法讀取基因序列。

9.Internal Control RNA

由於利用 RT-PCR 進行病毒基因的檢測極容易有偽陽性或偽陰性

的情形產生，加上糞便檢體中，常存在有許多的 RT-PCR 抑制劑，故在進行 RNA 抽取或進行 RT-PCR 時，加入 internal control RNA 是非常重要的步驟，以確保操作時沒有交叉感染，造成偽陽性或受到 RT-PCR 抑制劑的干擾，造成偽陰性。本研究在進行 RNA 抽取及進行 RT-PCR 反應時，均會加入人體上述病毒陽性的糞便檢體，以當作 internal control RNA。一旦發現檢體受到 RT-PCR 抑制劑污染時，會將抽取的 RNA 進行 10 倍到 100 倍的稀釋，以降低 RT-PCR 抑制劑的量。

10.資料分析方法

將上述得到的病原基因序列，先以 Lasergene software package (v5, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)的方法進行處理，再以 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 的方法，找到相似的病原基因序列後，將所有的序列利用 Clustal W (v1.83)在日本的 DNA Data bank 上進行排序之後，再進行演化樹的分析。

菌株或剩餘檢體將提供給疾管署進行確認分析，並提供定序相關資料進行人或畜牧場周邊水源環境調查比對。

叁、結果

1. 採集豬隻糞便檢體之豬場選定：本研究為瞭解本省各縣市豬隻對上述食媒性病 原的感染情形，依地理行政區分為北、中、南和東部 4 個地區豬場，每個月在不同地區各採集一場做檢測，如圖一所示。

2.豬隻糞便食媒性病原檢測結果：將採集豬隻糞便攜回實驗室進行上述食媒性病原之檢測。細菌檢測方面：將分離細菌純化和鑑定，之後以聚合酶連鎖反應再確認細菌。病毒檢測方面：從糞便上清液用 QIAGEN viral RNA Mini kit 抽取 RNA，RT-PCR 反應，寄生蟲檢測方面：將糞便上清液用 QIAGEN DNA Mini kit 抽取 DNA，進行 PCR 反應。至目前共檢測出陽性檢體輪狀病毒有 106 件，諾羅病毒有 6 件，E 型肝炎病毒有 1 件，沙氏桿菌有 9 件，腸毒素型大腸桿菌有 22 件，彎曲桿菌有 1 件，梨形鞭毛蟲有 16 件，隱胞子蟲有 19 件，至於 A 型肝炎病毒，梭狀桿菌，李斯特菌，阿米巴原蟲和弓蟲未檢測出陽性檢體。詳如表一所示。

3.依地理行政區域檢測豬隻糞便食媒性病原結果：為瞭解本省北、中、南和東部 4 個地區豬場對上述食媒性病原的感染情形，是否有地理區域的不同而影響食媒性病原的分佈，其結果發現輪狀病毒北部檢出率有 35 件，佔 12.7%最高，依序是南部檢出率有 29 件，佔 9.7%，中部和東部檢出率各有 21 件，佔 7.0%。 諾羅病毒北、中和南部各有 2 件，佔 0.67%。E 型肝炎病

毒只有北部地區有 1 件，佔 0.33%。沙氏桿菌東部有 5 件，佔 1.66%最高，依序是中部和南部有 2 件，佔 0.66%，北部有 1 件，佔 0.33%。腸毒素型大腸桿菌北部有 8 件，佔

2.67%最高，依序是南部 6 件，佔 2%，中部有 5 件，佔 1.66%，東部有 3 件，佔 1%。彎曲桿菌只有中部 1 件，佔 0.33%。梨形鞭毛蟲中部有 9 件，佔 3%最高，依序是南部有 6 件，佔 2%，東部有 3 件，佔 1%，北部有 1 件，佔 0.33%。隱胞子蟲南部有 7 件，佔 2.33%最高，依序是東部有 5 件，佔 1.67%，中部有 3 件，佔 1%，北部有 1 件，佔 0.33%。詳如表二所示。

4.依不同季節檢測豬隻糞便食媒性病原結果：為瞭解不同季節對上述食媒性病原的感染情形是否有影響，一般分春季(1-3 月)，夏季(4-6 月)，秋季(7-9 月)，冬季(10-12 月)，因尚未完成 11-12 月檢測，其暫時結果如表三所示。

5.依不同年齡檢測豬隻糞便食媒性病原結果：為瞭解不同年齡對上述食媒性病原的感染情形是否有影響，將豬隻分為哺乳豬、肥育豬和種母豬三個階段做檢測，其結果發現輪狀病毒在哺乳豬有 73 頭，佔 18.2%最高，其次是肥育豬 24 頭，佔 6%，種母豬 9 頭，佔 2.25%。腸毒素型大腸桿菌在哺乳豬有 13 頭，佔 3.25%最高，其次是肥育豬 8 頭，佔 2%，種母豬 1 頭，佔 0.62%。梨形鞭毛蟲種母豬有 9 頭，佔 2.25%最高，其次是哺乳豬 6 頭，佔 1.5%，肥育豬 4 頭，佔 1%。隱胞子蟲在哺乳豬有 10 頭，佔 2.5%最高，種母豬有

6 頭，佔 1.5%。

詳如表四所示。

肆、討論

一、分析本省養豬場在食媒性病原常見的種類

許多高危險性致病原藉由各種不同的食物為媒介造成人類的疾病，全世界每年藉由食物媒介引起的疾病，估計每年約有 6 千 8 百萬至 2 億 7 千 5 百萬人發生，嚴重的病例需住院治療，甚至造成死亡，嚴重的影響經濟損失頗巨(16,23)。目前已知食媒性病原有 31 種之多，包括細菌、病毒、寄生蟲等等，其中最重要的是引起人類的食物中毒外，亦造成感染動物的疾病，而感染動物的種類範圍廣泛，在這些致病性病原中，常與國人健康習習相關。從本次計畫的檢測中發現病原比例依序是輪狀病毒、腸毒素型大腸桿菌、梨形鞭毛蟲、隱胞子蟲、沙氏桿菌、諾羅病毒、E 型肝炎病毒和彎曲桿菌。過去本省對豬隻糞便中引起人畜共通傳染病的非通報疾病的研究甚少，只有少數如沙氏桿菌和大腸桿菌的感染有報告，也著重於血清型別和抗藥性的分析，而無全省性的流行病學調查，故無法做進一步的比較分析其盛行率及感染途徑，但從本計畫的結果得知有 8 種食媒性病原的檢出，可見本省豬隻糞便中含有食媒性病原的存在，值得重視並請養豬場工作人員勿必小心，重視環境的清潔、衛生和消毒工作，減少被感染的危險

性。

二、養豬場環境的監測：

食媒性病原無所不在，尤其是養豬場周邊的環境，因為這些病原可藉由各種管道傳染給豬隻，有些病原感染不同年齡的豬隻後，其臨床症狀不一，有從不顯性到急性的臨床症狀，最可怕的是不顯性感染，又持續的排出病原造成汙染周遭的環境，使病原永遠存在養豬場並使易感性的動物感染發病。在本次計畫中發現不同年齡豬隻檢測結果有輪狀病毒、隱胞子蟲和腸毒素型大腸桿菌在哺乳豬發生率最高，此結果和國內外論文發現的現況相似(1,5,18,23,27)。而梨形鞭毛蟲和沙氏桿菌在種母豬發生率最高，此結果顯示這兩種病原會持續污染養豬場，造成感染其它年齡豬隻，這也是養豬場最感頭痛的問題之一，因種母豬在養豬場生存時間很長，一旦種母豬檢測有這兩種病原，最好防治的方法即先隔離治療，豬場再做徹底的消毒工作，如無法根除則將陽性種母豬淘汰，以絕後患。至於養豬場環境的監測也要重視飼料、飲水、野生動物如犬和貓及運豬車輛的檢測和消毒工作，因有些病原如沙氏桿菌、腸毒素型大腸桿菌、彎曲桿菌、梭狀桿菌和李斯特菌會藉由污染飼料和飲水感染豬隻，也是豬隻感染沙氏桿菌和腸毒素型大腸桿菌最常見的途徑之一，此結果和國內外論文發現的現況相似(6,12,16,17,22)。

三、分析本省養豬場在食媒性病原危險因子的分析：

為瞭解動物感染食媒性病原的情形，今年選定本省經濟動物與國人有密切關係的豬隻對上述病原的盛行率調查，在食物中毒的感染過程中，過去的文獻報告中有發現，在致病原造成人類感染前，經由環境或動物宿主再以不同的傳播途徑給人類。本計畫將探討與國人健康有密切關係的豬隻危險因子(包括病原種類、地區環境、季節和年齡)，分析這些危險因子與疫情流行的概況是否相關性，從本計畫的結果顯示，檢測十三種本省常見的食媒性病原中，截至目前共檢測出八種食媒性病原(即輪狀病毒、腸毒素型大腸桿菌、梨形鞭毛蟲、隱胞子蟲、沙氏桿菌、諾羅病毒、E 型肝炎病毒和彎曲桿菌)、另五種食媒性病原未檢測出陽性檢體。依地區環境四個行政區域都有檢測出陽性檢體的有輪狀病毒、隱胞子蟲、沙氏桿菌和腸毒素型大腸桿菌。依不同季節(春、夏、秋、冬)都有檢測出陽性檢體的只有輪狀病毒。依不同年齡(哺乳豬、肥育豬、種母豬) 都有檢測出陽性檢體的有輪狀病毒、諾羅病毒、梨形鞭毛蟲和腸毒素型大腸桿菌。因本計畫須進行到今年十二月底，尚差兩個月，故危險因子的分析目前無法做最後確定。唯以目前的資料分析，亦可提供農政單位對疾病防控參考的依據。檢驗結果呈陽性豬場，與疾管署主辦人員聯繫，將陽性檢體送回 CDC 以供基因比對，

探討人畜共通傳染病之親緣關係。

伍、結論與建議

1.至目前檢測 1200 頭豬隻糞便對上述食媒性病原菌檢測出有 8 種病原菌，即諾羅病毒、輪狀病毒、E 型肝炎病毒(HEV)、沙氏桿菌、彎曲桿菌、李斯特菌、腸毒素型大腸桿菌、隱胞子蟲和梨形鞭毛蟲，而 A 型肝炎病毒(HAV)、梭狀桿菌、李斯特菌、阿米巴原蟲和弓蟲未被檢測出。

2.檢測有陽性的食媒性病原菌中，以輪狀病毒檢出率(106 件)最高、依序是腸毒素型大腸桿菌(22 件)、梨形鞭毛蟲(19 件)、隱胞子蟲(16 件)、沙氏桿菌 (10 件)、諾羅病毒(6 件)、E 型肝炎病毒和彎曲桿菌各 1 件。顯示豬隻糞便中有食媒性病原菌的存在，相關防疫單位須注意。

3.目前全省上半年養豬場發生豬流行性下痢(PED)，死亡率高，以至有些養豬場不願接受糞便採集。

4.所檢測的食媒性病原在我國豬隻疾病中，大部分是非法定傳染病，如有發生不需通報防檢局報備，較易被部分養豬場主人接受採集檢測。

5.採集檢體前，均向養豬場主人說明採集檢測的目的和檢測項目，如檢測有陽性例，會以電話聯絡，並告知如何防治。此項計畫建議分年持續進行檢測，其結果更能讓養殖戶對所飼養的動物健康更具信心，讓國人對人畜共通傳染病的重要性更進一步的了解。

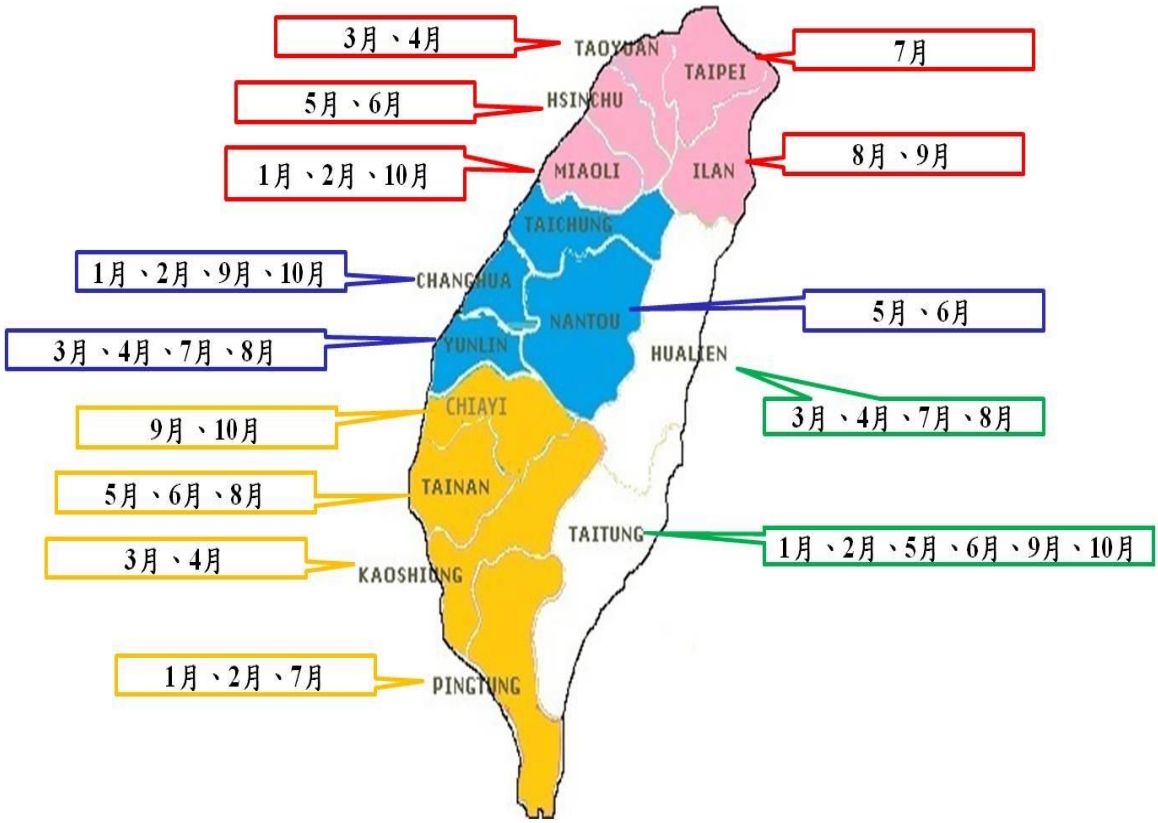
陸、參考文獻

1. Alfieri AA, Leite JP, Alfieri AF, Jiang B, Glass RI, and Gentsch JR. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. J Virol Methods. 1999. 83:35-43.
2. Barroso LA, Wang SZ, Phelps CJ, Johnson JL, and Wilkins TD. Nucleotide sequence of Clostridium difficile toxin B gene. Nucleic Acids Res. 1990. 18:4004.
3.Bezerra RA, Carvalho FS, Guimaraes LA, Rocha DS, Silva FL, Wenceslau AA, and Albuquerque GR. Parasitol Res. 2012. 110:509-514.
4.Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, and Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of Listeria monocytogenes in food samples by colony htbridization and rapid detection by PCR. Research Microbiology. 1992. 143:271-280.
5.Budu-Amoako E, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, Hurnik D, Estey C, and McClure JT. Occurrence of Giardia and Cryptosporidium in pigs on Prince Edward Island, Canada. Veterinary Parasitology. 2012. 184:18-24.
6.Chiu TS, Chen TR, Hwang WZ, and Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of Salmonella spp in food. J Microbiol. 2005. 97:259-265.
7. Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, and Purcell RH. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2002; 40(12):4576-4580.
8.Fermer CH, and Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacter, Campylobacter Jejuni, C. coli, C. lari, and C. upsaliensis. J Clin Microbiol. 1999. 37:3370-3373.
9.Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Trancillard P, Bost M, Gofti L, Zmirou D, and Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. 2000. 66(6):2690-2692.
10.Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, and Chavalitshewinkoon-Petmitr P. Differential detection of E.histolytica, E.dispar, and E. moshkovskii by a single- round PCR assay. J. Clin. Microbiol. 2006. 44:3196-3200.
11.Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, and Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different

geographic regions of the United States. J.Clin.Microbiol. 2002. 40(4):1326-1332.
12. http://www.cdc.gov
13.Lee AR, Lee SG, Kang LH, Jheong WH, and Paik SY. Full-length genomic sequence of subgenotype IIIA hepatitis A virus isolate in republic of Korea. BioMed Research International. 2013. ID 426034.
14.Lee WC, Lee MJ, and Kim JS. Food-borne illness outbreaks in Korea and Japan Studied retrospectively. J Food Protect. 2001. 64:899-902.
15.Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 9th. ASM press. 2007.
16.Naravaneni R, and Jamil K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. Journal of medical Microbiology. 2005. 54:51-54.
17.Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, and Horng CB. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan. J Clin Microbiol. 1997. 35(5):1260-1262.
18.Pass MA, Ordedra R, and Batt RM. Multiplex PCRs for identification of Escherichia coli virulence genes. J Clin Microbiol. 2000. 38:2001-2004.
19.Qu XX, Hao P, Song XJ, Jiang SM, Liu YX, Wang PG, Rao X, Song HD, Wang SY, Zuo Y, Zheng AH, Luo M, Wang HL, Deng F, Wang HZ, Hu ZH, Ding MX, Zhao GP, and Deng HK. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fot its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. The Journal of Biological Chemistry, 2005; 280(33):29588-29595.
20.Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H, and Saif LJ. Reverse transcription- PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human valiciviruses. J Clin Microbiol. 2003. 41:3089-3099.
21.Straw BE, Zimmerman JJ, Allaire AD, and Taylor DJ. Diseases of swine. 9th. Blackwell publishing. 2006.
22.Su HP, Chiu SI, Tsai JL, Lee CL, and Pan TM. Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995-2001. J Infect Chemother. 2005. 11:146-151.
23.Todd.E. Preliminary estimates of costs of foodborne diseases in United States. J.Food Prot. 1989. 52:595-601.
24.van Asten Alpgons JAM, Allaart JG, Meeles AD, Gloudemans Peggy WJM, Houwers DJ, and Grone A. A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all variants of the Clostridium perfringens cpb2 gene. Veterinary Microbiology. 2008. 127:412-416.
25.Ward RL, Jin Q, Nakagomi O, Sander DS, Gentsch JR. Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotavirus in coinfected cells. Arch Virol. 1996; 141(3-4):615-633.

26. Wim HM. van der Poel, Jan Vinje, Reina van der Heide, Maria-Inmaculada Herrera, Amparo Vivo, and marion P.G. Koopmans. Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals. Emerging Infectious Diseases. 2000; 6(1):36-41.
27. Yin J, Shen Y, Yuan Z, Lu W, Xu Y, and Cao J. Prevalence of the Cryptosporidium pig genotype II in pigs from the Yangtze River Delta, China. PLoS One. 2011. 6(6):1-4

柒、圖表



圖一、檢測豬隻糞便地區分佈分析圖

表一、豬隻糞便食媒性病原檢測分析結果

	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Total
Rotavirus	3/120	17/120	13/120	24/120	13/120	7/120	7/120	10/120	12/120	0/120	106/1200(0.83%)
Norovirus	0/120	2/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	1/120	3/120	0/120	6/1200(0.5%)
HAV	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
HEV	0/120	0/120	1/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	1/1200(0.08%)
Amoebiasis	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
Cryptosporidium	0/120	2/120	0/120	0/120	5/120	0/120	9/120	0/120	0/120	0/120	16/1200(1.33%)
Giardiasis	2/120	7/120	2/120	0/120	1/120	6/120	1/120	0/120	0/120	0/120	19/1200(1.58%)
Toxoplasmosis	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
Salmonella enterica	3/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	1/120	3/120	3/120	9/1200(0.75%)
Clostridium perfringens	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
Clostridium difficile	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
Enterotoxigenic Escherichia coli	0/120	8/120	1/120	0/120	7/120	4/120	0/120	2/120	0/120	0/120	22/1200(1.83%)
Listeria monocytogenes	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/1200(0.00%)
Campylobacter spp	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	0/120	1/120	0/120	0/120	0/120	1/1200(0.08%)

表二、豬隻糞便食媒性病原依行政區域檢測分析結果

	Northern	Central	Southern	Eastern
Rotavirus	35/300(11.6%)	21/300 (7.00%)	29/300 (9.66%)	21/300 (7.00%)
Norovirus	2/300 (0.66%)	2/300 (0.66%)	2/300(0.66%)	0/300 (0.00%)
HAV	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
HEV	1/300 (0.33%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Amoebiasis	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Cryptosporidium	1/300 (0.33%)	3/300 (1.00%)	7/300 (2.33%)	5/300 (1.66%)
Giardiasis	1/300 (0.33%)	9/300 (3.00%)	6/300 (2.00%)	3/300 (1.00%)
Toxoplasmosis	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Salmonella enterica	1/300 (0.33%)	2/300 (0.66%)	2/300 (0.66%)	5/300 (1.66%)
Clostridium perfringens	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Clostridium difficile	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Enterotoxigenic Escherichia coli	8/300 (2.66%)	5/300 (1.66%)	6/300 (2.00%)	3/300 (1.00%)
Listeria monocytogenes	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)
Campylobacter spp	0/300 (0.00%)	1/300 (0.33%)	0/300 (0.00%)	0/300 (0.00%)

表三、豬隻糞便食媒性病原依不同季節檢測分析結果

	spring	summer	autumn	winter
Rotavirus	50/360(13.8%)	24/360(6.66%)	12/360 (3.33%)	20/120 (16.67%)
Norovirus	0/360(0.00%)	1/360(0.27%)	3/360 (0.83%)	2/120 (1.67%)
HAV	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
HEV	0/360(0.00%)	1/360(0.27%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Amoebiasis	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Cryptosporidium	5/360(1.38%)	9/360(2.5%)	0/360 (0.00%)	2/120 (1.67%)
Giardiasis	3/360(0.83%)	7/360(1.94%)	0/360 (0.00%)	9/120 (7.5%)
Toxoplasmosis	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Salmonella enterica	0/360(0.00%)	1/360(0.27%)	6/360 (1.67%)	3/120 (2.5%)
Clostridium perfringens	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Clostridium difficile	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Enterotoxigenic Escherichia coli	8/360(2.22%)	6/360(1.66%)	0/360(0.00%)	8/120 (6.67%)
Listeria monocytogenes	0/360(0.00%)	0/360(0.00%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)
Campylobacter spp	0/360(0.00%)	1/360(0.27%)	0/360 (0.00%)	0/120 (0.00%)

表四、豬隻糞便食媒性病原依不同年齡檢測分析結果

	Piglet	Sow	Fatten pig
Rotavirus	73/400 (18.2%)	9/400 (2.25%)	24/400 (6.00%)
Norovirus	1/400 (0.25%)	2/400 (0.50%)	3/400 (0.75%)
HAV	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
HEV	0/400 (0.00%)	1/400 (0.62%)	0/400 (0.00%)
Amoebiasis	0/400(0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
Cryptosporidium	10/400 (2.50%)	6/400 (1.50%)	0/400 (0.00%)
Giardiasis	6/400 (1.50%)	9/400 (2.25%)	4/400 (1.00%)
Toxoplasmosis	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
Salmonella enterica	0/400 (0.00%)	6/400 (1.50%)	4/400 (1.00%)
Clostridium perfringens	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
Clostridium difficile	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
Enterotoxigenic Escherichia coli	13/400 (3.25%)	1/400 (0.62%)	8/400 (2.00%)
Listeria monocytogenes	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)
Campylobacter spp	1/400 (0.62%)	0/400 (0.00%)	0/400 (0.00%)