

計畫編號：MOHW105-CDC-C-114-122109 &
MOHW104-CDC-C-114-112101

衛生福利部疾病管制署 105 年委託科技研究計畫

計畫名稱：氣候變遷對於原蟲類病原體環境分布之監測與評估

104-105 年度全程研究報告

執行機構：國立陽明大學 醫學系熱帶醫學科

計畫主持人：嵇達德副教授

研究人員：陳榮盛、施宜佳、黃東益、陳文仁、許又文、李冠穎

執行期間：104 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 206 萬元整

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
封面	
目錄	
摘要	(3)
前言	(7)
材料與方法	(1 4)
結果與討論	(2 4)
結 論 與 建 議	(5 0)
重 要 研 究 成 果 及 具 體 建 議	(5 3)
參 考 文 獻	(5 5)
圖 與 表	(6 3)

中文摘要:

棘阿米巴原蟲 (*Acanthamoeba*) 及奈格里阿米巴原蟲 (*Naegleria*) 屬自由營生性阿米巴原蟲，普遍存在於環境水體中，其中許多種蟲株已被證實會造成人體健康的危害。在本研究中，我們建立了標準檢驗方法來鑑定棘阿米巴原蟲、及奈格里阿米巴原蟲，及建置標準水體樣本中原蟲的檢樣流程，並因已調查上述病原體在溫泉、民生畜牧廢水、飲用水源水庫及溪流水體等四種不同種類水體中的檢出率。此外，亦同時檢測梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲及微孢子蟲等其他三種水媒性原蟲病原體的檢出率。結果顯示，本年度梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲和微孢子蟲於溫泉、飲用水源水庫及溪流水體均未檢出，但87個民生畜牧廢水共檢測出2株隱孢子蟲與1株梨形鞭毛蟲。本研究結果顯示兩種自由營生阿米巴原蟲檢出率分別平均為20%左右。第一年度，棘阿米巴分子鑑定結果則顯示，飲用水源水庫水體及溪流水體主要為 *Acanthamoeba castellanii* 及 *A. polyphaga*，溫泉水體則以 *A. jacobsi* 為主。分析水體種類與自營性阿米巴分布之關聯性發現，棘阿米巴原蟲較常出現於溪流與水庫水體，且存在的型別多與人類疾病有關，而溫泉水體則多為奈格里阿米巴。而第二年度，棘阿米巴原蟲分子鑑定結果則顯示，不論何種水體中高度感染風險的 *Acanthamoeba* T4 基因型佔57.6%，這是值得關注的議題。第二年度另建置之以少量樣本檢驗角膜條微孢蟲檢驗方法，並成功檢測溫泉水體中平均約有20%的分佈，在溪流水庫樣本中檢出率更高達90%。本研究並完成水質指標對兩種自由營生阿米巴原蟲的統計分析，發現在鹽度對兩種自由營生阿米巴原蟲有不同顯著相關性，且顯示奈格里阿米巴原蟲易受水質影響。本年度進行氣象因子對自由營生阿米巴原蟲檢出狀況進行邏輯斯迴歸，發現奈格里阿米巴原蟲易受短期氣候因子影響，包含三日平均

降雨量、三日平均濕度及平均日照量等。季節的分布上，自營性阿米巴原蟲在溪流水體與水庫水體中的檢出高峰為一般為春夏季，但近兩年因氣候變遷加大，已影響自營性阿米巴的季節分布。

關鍵字：棘阿米巴原蟲、奈格里阿米巴原蟲、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲、微孢子蟲、角膜條微孢蟲、溫泉、飲用水源水庫水體、溪流水體、季節、邏輯斯迴歸

Abstract:

Acanthamoeba spp., and *Naegleria* spp. are ubiquitous free-living amoebae (FLA) that inhabit in aquatic environments. Several species within these genera are recognized as potential opportunistic human pathogens. In this study, we survey the appearance of *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia* by using analytical procedures of molecular biology at four different water source areas (i.e. hot spring water, effluent discharge from husbandry, water of reservoirs and water of stream) in Taiwan. Moreover, we also check the presence of three waterborne pathogenic Protozoan, i.e. *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia*. The results concluded that 2 cases of *Cryptosporidium* and 1 case of *Giardia lamblia* were detected from 87 samples of effluent discharge of husbandry, and none was found in samples from hot spring water, reservoir or stream water. The detection rates in both FLA were about the level of 20%. In first year, according to the identified species of *Acanthamoeba*, the dominant species at drinking source water and stream water included *A. castellanii* and *A. polyphaga* and the dominant species at hot spring water were *A. jacobsi*. The comparison with water types and detection rate of amoeba indicated that drinking source water and stream water samples often found genus *Acanthamoeba* and most species of them were related to human diseases, but *Naegleria* was the dominant Free-living amoeba at hot spring. In second year, genetic sequence analysis of *Acanthamoeba* reveal the detection rates of T4 genotype, a high-risk genotype associated with amoebiasis, were 57.6% amid all the samples tested, which uncovered a serious concern of public health. We have established an examining procedure to carry out a testing for *Vittaforma corneae* through a relative small amount of environmental aquatic samples. The detection rates were 20% from samples of hot spring and 90% from stream water. In the

studies of regression analysis on water quality versus both FLA, our results suggested *Naegleria* spp was relatively sensitive to water quality. On the other hand, the results of regression analysis on climate factors versus FLA indicated an average amount of rainfall, humidity, and illuminance of three days prior to sampling day affected the detection rates. In general, the seasons of higher detection rates occurred in spring and summer, which might have been affected by climate change in this year.

Keywords: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Microsporidia*, *Vittaforma corneae*, hot spring water, drinking source water, stream water, season, Logistic regression

報告本文

一、前言

全球氣候的變化很可能連帶影響傳染病之流行，聯合國政府間氣候變遷問題小組（IPCC）的研究指出，現今全球已可感受到氣候變遷的衝擊，恐將導致地區的動盪和衝突，某些地區降雨模式也將受到影響，特別是在歐洲和亞洲地區將大幅提升洪水發生的風險，進而影響農業並引發水媒性及蚊媒性傳染病，將影響人民健康與福祉。近幾年，我國相關衛生研究機構（國家衛生研究院、中央研究院、疾病管制署、衛生福利部及相關各大院校）針對氣候與健康之關聯性研究有群體性計畫進行中，已發現傳染病與氣候(降雨或氣溫等)有顯著相關性，如成功大學研究指出，諾羅病毒感染案例與降雨量之間為延遲3日之效應存在(洪國展,2013)，而其他研究更指出豪大雨後或氣溫上升會導致登革熱疫情之擴散，尤其近幾年氣候變遷的影響已導致登革熱群體爆發事件北移等(蘇慧貞,2009)。上述研究均為臨床案例與氣候做連結之探討，然對於環境中微生物存在與氣候之變化關聯仍待探討，但氣候變遷仍被視為影響人類健康的重要影響因素，故從感染源頭探討氣候變遷對環境中致病性微生物影響屬重要之議題，可完整提供臨床與氣候之間重要媒介之資訊，以利於未來更完整的傳染病預測與預防。

根據世界衛生組織統計，在開發中國家約有80%的疾病與33%的死亡原因與當地飲用水遭到致病性微生物污染有著密切的關係(WHO, 2003)。水中致病微生物的可能來源包括畜產動物養殖之糞污排放、家庭生活污水、齧齒動物及野生動物所帶之病原體藉由暴雨逕流進入水體，以及原本就存留在水體或土壤中的伺機性致病微生物。會引發水媒疾病流行的致病性微生物包括多種的細菌、原生動物及病

毒，這些致病性微生物的大小、生理特性以及感染宿主的情形都不相同，在水體中的生存及流佈狀況亦有很大的差異。但對於存在於水體中之致病性微生物，如何分析與檢驗，更是一大挑戰。由於致病性微生物檢測較為困難，且致病性微生物在水體的存活型態，也會受水體狀況的改變而影響。為了對水中致病性微生物有更多的瞭解並加以控制，檢測技術的建立、淨水技術的改進、水質長期監測系統的建立，以及配合流行病學的調查建立資料庫，乃是控制水媒疾病發生的最佳方法。

除了飲用水污染為水媒性疾病的主要感染途徑之外，在受污染的水體中進行水上活動或食用受致病微生物污染的水產品及農作物，亦會造成感染，並有可能造成疾病的大流行(WHO, 2003)。台灣地處亞熱帶，環境水體營養源豐富且溫度適合微生物的生長，感染水媒疾病之風險相對較高。同時，近年來台灣由於國民生活品質的日益提升，運動休閒活動已成為國人非常重視的一環，其中各種親水性活動如游泳、溯溪、泡湯等更是為許多人所喜愛。但目前國內溫泉及泳池檢驗多僅針對指標性微生物如 *E. coli* 等進行例行性抽檢，對於其他水中致病性微生物，並未嚴加控管，遑論其他水體。溫泉及泳池中常含有細菌、病毒、黴菌及原蟲等許多致病性微生物，而溫泉中含有大量豐富的礦物質，更有利於自營性阿米巴原蟲如棘阿米巴原蟲 (*Acanthamoeba* spp.)、奈氏阿米巴原蟲 (*Naegleria* spp.) 等的生長 (Sheehan et al., 2003)。另外，有研究指出退伍軍人菌可寄生於某些自營性阿米巴原蟲中(于台珊, 2005)，可能對國人健康會造成危害。台灣飲用水源頭大多位於山區，然而，近年來畜牧業卻往山區移動及觀光產業發展，使得山區過度開發，已造成水源區之水污染問題。水源中可能存有會感染人類的病原菌，如自營性阿米巴原蟲(Free-Living

Amoebae)、梨形鞭毛蟲(*Giardia*)、隱孢子蟲(*Cryptosporidium*)、退伍軍人菌(*Legionella spp.*)、產氣單胞菌(*Aeromonas spp.*)、大腸桿菌(*E. coli*)、彎曲桿菌(*Campylobacter*)、沙門氏菌 (*Salmonella spp.*)、耶辛尼氏菌(*Yersinia spp.*)、沙雷菌(*Serratia spp.*)、克雷白氏菌(*Klebsiella spp.*)以及志賀氏桿菌(*Shigella spp.*)等(Water Treatment Solutions Lenntech,1997)，若淨水程序不足以去除這些致病菌，即可能透過飲用水造成疾病之大流行。美國統計自 1991-1998 年間，共爆發 126 件因飲用水遭受污染的疾病大流行(Craun et al., 2002)。水媒性原蟲感染所引起的腹瀉疾病，以隱孢子蟲及梨形鞭毛蟲為主。此外，國內外民眾因使用受病原體污染之地下水或山泉水而造成傳染病流行事件亦時有所聞。

自營性阿米巴原蟲可經水而感染人類，造成棘阿米巴原蟲角膜炎(Acanthamoeba Keratitis, AK)、肉芽腫性阿米巴原蟲腦炎(Granulomatous Amebic Encephalitis, GAE)及原發性阿米巴原蟲腦膜腦炎(Primary Amebic Meningoencephalitis, PAM 等疾病，後兩者可造成極高的致死率(Walochnik et al.2008；John, 1982)。美國近年來有連續有「食腦蟲」入侵人體，導致死亡的案例。這些案例大多是在湖邊或是游泳池戲水而感染，福氏奈格里阿米巴原蟲(*N. fowleri*)進入鼻腔後可沿嗅神經進入腦部，並侵犯腦組織造成嚴重損傷(Rivera et al., 1989 & 1993; Rodriguez-Zaragoza, 1994)。台灣亦於 2011 年底發現第一例因泡溫泉而感染原發性阿米巴原蟲腦膜炎死亡的病例(Su et al., 2013)，隨後本研究團隊亦在病患感染之溫泉檢出相同基因型之福氏奈格里阿米巴原蟲(Tung et al., 2013)。此外，台灣第一例肉芽腫性阿米巴原蟲腦炎病患則因在稻田中跌倒嗆水而感染(Sheng et al., 2009)。國內亦有報告國人因在溪水中遊憩、做水療 SPA 與泡溫泉時

戴隱形眼鏡下水或是因個人隱形眼鏡保養不潔，而感染棘阿米巴原蟲或是角膜條微孢蟲 (*Vittaforma corneae*) 而導致角膜炎發生潰爛、視力衰退、嚴重者會失明的病例，所以有必要對於水中的自營性原蟲進行監測(Fang et al., 2012)。

棘阿米巴原蟲 (*Acanthamoeba spp.*) 廣泛存在於環境中，目前用形態學標準分類已超過 24 種蟲種 (Visvesvara, 2007)。其生命週期有兩個階段，在適合的環境中活動體可以偽足移動並以二分裂法進行繁殖，在環境惡劣時活動體會轉變成囊體，以抵抗不良環境。當病患感染時，棘阿米巴原蟲活動體或囊體可經由眼睛、鼻腔或皮膚傷口進入人體，產生危害。除形態學分類外，也可利用 18S rRNA 基因序列上核糖體的 12 個變異區差異來分型 (Gast et al., 1996)，目前依其基因序列差異可分為 17 個基因型別，其中 T2、T4、T6、T10 及 T12 基因型可引發肉芽腫性阿米巴原蟲腦炎(GAE)，而 T3、T4 及 T10 型與阿米巴原蟲角膜炎(AK)有關。

奈格里阿米巴原蟲 (*Naegleria*)，於 1899 年首次被 Schardinger 發現，命名為 *Amoeba gruberi*，到二十世紀初才被 Alexeieff 改為 *Naegleria* (Alexeieff, 1912； Khan, 2008)，喜歡生長於較高溫的環境水體中，甚至可忍受 45°C 以上的高溫，每年較溫暖的月份就是奈格里阿米巴原蟲大量繁殖的期間(Marciano-Cabral, 1988, 2003; Visvesvara et al., 2007)，生活使除具有活動體及囊體外，某些時期亦會產生具雙鞭毛的鞭毛體(Carter, 1970； Ma et al., 1990)。在乾燥、pH 值的變化、極端的溫度以及代謝廢物的累積時活動體會轉變為囊體(Chang, 1978； Schuster, 2002)。目前奈格里阿米巴原蟲有超過三十種以上之血清型別，但只有福氏奈格里阿米巴原蟲(*N. fowleri*)會引發急性的原發性阿米巴原蟲腦膜腦炎 (PAM)，導致病患在感染後 3-7 天內死亡(John,

1982； Cain et al., 1981)，福氏阿米巴原蟲可以從鼻腔內經過嗅覺神經上皮細胞並沿嗅覺神經上移，侵入大腦，引起出血性壞死和水腫 (Carter, 1970)。有學者表示，全球暖化可能造成水的溫度上升，因此可能造就 *Naegleria fowleri* 的適合生存環境，導致此類致死性極高的疾病感染風險增加 (Cogo et al., 2004)。

梨形鞭毛蟲症 (Giardiasis) 是由 *G. lamblia* 所引起，分布遍及全世界，是人類腸道最常見的鞭毛蟲，為有四對鞭毛雙側對稱狀似梨形的原蟲。成熟的囊體 (cyst)，會隨糞便排出體外，可在水中存活數月。人類多飲用受囊體污染的水源及食物而發病，人跟人之間也可能經由糞口接觸而傳播，感染後多無症狀，有些人會出現漸發性腹瀉，症狀可分急性或慢性、持續性或間歇性，亦可出現腹痛、嘔吐、厭食、疲倦及體重減輕等症狀，病人多數會自然痊癒，但有些會演變成慢性感染。由於 *G. lamblia* 有許多型別，在形態學上很難區分，亦缺乏其對疾病重要性的資訊。因此，需建立適合的基因分型技術來區分其種類及型別，並用資料庫來分析在我國的盛行率與流行學分佈。

隱孢子蟲症 (Cryptosporidiosis) 主要由小隱孢子蟲 (*Cryptosporidium parvum*) 及人隱孢子蟲 (*C. hominis*) 所引起，孢子蟲經口食入，入侵小腸發育為滋養體，造成慢性腹瀉，屬世界性分佈的人畜共通傳染病。正常人感染多為自限性腹瀉，但 HIV/AIDS 患者表現多為慢性非自限性腹瀉，病程長可達數月，嚴重者可因脫水多達 12-12 L 及營養不良而致病。檢查方法以傳統糞便抗酸染色及 safarin-methylene blue 染色鏡檢卵囊體，亦可以 PCR 診斷糞便中的隱孢子蟲。其他如環孢子蟲 (*Cyclospora spp.*) 及微孢子蟲 (*Microsporidium spp.*) 等腹瀉寄生蟲，也可經污染水源及食物而糞口接觸傳播，引起無症狀至嚴重腹瀉不等的疾病。

微孢子蟲型別多達 1500 多種以上，早期被認為是原生動物一種，但後來的基因體學研究發現其應歸類於真菌類，而其主要寄生於動物體內，部分物種與人類疾病有關，根據美國 CDC 研究與人類疾病相關分類，主要可分成腹瀉感染、眼睛感染及其他部位感染三大類(CDC, 2015)，但目前台灣地區並無針對此類微生物的環境研究報告。臨床研究方面，於 2011 年台北榮總眼科團隊針對微孢子蟲眼疾的研究指出(Fan *et al.*, 2012)，在 9 個病患當中，均有泡溫泉習慣，而微孢子蟲的種別均為角膜條微孢蟲(*Vittaforma corneae*)，顯示在台灣溫泉水體中，此病原菌可能存在，故列為本年度研究之重點。

已有許多證據顯示，全球暖化已引起許多地區氣候系統混亂、生態系統衝擊，並危及人類生存環境(IPCC, 2014)。受全球氣候變遷氣象因子改變的影響，自然生態及環境中植物、動物及各類微生物之繁衍與分布之改變，可能導致流行疾病的嚴重度與分佈狀況隨之改變(WHO, 2003)，特別是透過水及昆蟲為媒介傳播之疾病，對於氣候條件之變異尤其敏感(Patz *et al.*, 2000; Gubler *et al.*, 2001; Rose *et al.*, 2001)。隨著各類生態系統及生物多樣性之變化，亦可能間接影響微生物與各物種間之平衡，繼而引發人畜共通與新興傳染病。因此，美國地質調查所(USGS) 與美國疾病管制中心已相繼投入與環境衛生相關之研究，主題尚包括：(1)空氣、粉塵、土壤中的污染物及致病性微生物(2)飲用水污染議題(3)具生物累積性污染物議題(4)病媒傳播及人畜共通之傳染性疾病(5)遊憩用水安全。其中需多項與水媒性原蟲有關。

因此，在氣候變遷影響下，過去罕見的單細胞原蟲，如梨形鞭毛蟲、微孢子蟲及隱孢子蟲等，已屢見疫情如前所述，而環境中自由營生的阿米巴原蟲型態與型別上的變異是否受到氣候變遷影響，病原性

阿米巴原蟲是否增加等問題，及水媒性原蟲病原體在國內分佈與風險等相關流行病學背景資料仍不夠完善。是故，建立國內重要水媒途徑感染之原蟲分布與風險資料，作為研訂政策之參考及未來發生疫情之因應，乃為本計畫研究之目的。本計畫除持續收集臺灣地區氣候變遷與原蟲類病原體相關資料，亦將針對之環境流行病學進行環境調查及相關因應策略研究為本年度計畫重點。本研究第一年度分析探討棘阿米巴原蟲、福氏奈格里阿米巴原蟲、微孢子蟲、梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲等原蟲整年度不同水體的存在情形與型別進行分析，並探討受到氣候變遷影響（如溫度、降水等）影響產生之分布變化，進而評估建構可考量臺灣氣候因子之傳染性流行疾病監視系統的可行性，以利作為疾病預防宣導之參採。

本計畫第一年度目前所得之成果為：(1) 從台灣北中南東四個區域的三種不同水樣來源原蟲性病原體檢測分析結果。(2) 環境蟲株分離與 DNA 保存方法建立與材料樣本存放。(3) 水體樣本之原蟲採樣分析流程建立與鑑定方法之標準操作程序。(4) 同一物種不同 PCR 基因區段引子測試與水體樣本實驗最佳化。(5) 環境水體中自營性原蟲分布情形、發生率及濃度調查之建立。(6) 初步與氣候資料連結分析討論之結果。(7) 第二年度計畫之建議與改進。

本計畫第二年度目前所得之成果為：(1) 延續第一年度從台灣北中南東四個區域的三種不同水樣來源原蟲性病原體檢測分析結果(冬季至夏季)。(2) 微孢子蟲與其他原蟲檢驗方法改善。(3) 原蟲檢出率與水質指標相關性分析。(4) 自營性阿米巴原蟲型別分析與角膜條微孢子蟲基因型別分析。(5) 原蟲存在情形與氣候資料連結使用邏輯斯迴歸分析之討論。(6) 期刊論文投稿與發表。(7) 第二年度計畫所提供之未來建議與改進。

二、材料與方法

1. 採樣地點與採樣樣本數

本研究第一年度採樣地點的規畫如原計畫書所示，針對台灣地區北中南東四個區域整年度收集三種不同來源之水體樣本，包含：至少 40 個水庫自來飲用原水水源，至少 30 個溪流河川原水水體及至少 30 個溫泉水體樣本。其中溪流河川原水水體樣本以嘉義朴子溪為主要研究對象，於全程期末報告撰寫時，已針對四季均進行採樣，樣本數為每次 24 個採樣點，採樣點分佈如 1A 所示，採樣點詳細經緯度與地標如表 1 所示，故目前合計 96 個水體樣本，並收集了全台四季各主要溪流水體樣本，合計 48 個樣本，其分佈如圖 2B 所示，故溪流樣本合計共採樣 168 個水體樣本。全台飲用水源水體樣本部分，共收集全台各區域 21 個飲用水源地區樣本，其採樣點如圖 2B 所示，四季共計 76 個樣本。溫泉水體部分，其採樣溫泉區分佈如圖 3 所示，合計全年度共採樣 76 個溫泉水體樣本。故採樣數量均符合原第一年度計畫申請書之要求。

本研究第二年度採樣地點的規畫如原計畫書所示，針對台灣地區北中南東四個區域整年度收集三種不同來源之水體樣本，包含：至少 60 個水庫自來飲用原水水源，至少 60 個溪流河川原水水體及至少 40 個溫泉水體樣本。其中溪流河川原水水體樣本以嘉義朴子溪為主要研究對象，於期末報告撰寫時，已針對冬春夏三季進行採樣，預計 11 月 25 日進行秋季採樣，故目前合計採樣次數為 4 次，樣本數為每次 24 個採樣點，採樣點分佈如圖 1A 所示，採樣點詳細經緯度與地標如表 1 所示，故目前合計 72 個水體樣本，本根據去年委員建議採集朴子溪相關畜牧廢水，採樣點分布如圖 1B 所示，每季共採檢 29 個水體樣本，目前採集冬春夏三季樣本，合計 87 個水體樣本。並收集了全

台四季各主要溪流水體樣本(已採集冬春夏季樣本)，合計 33 個樣本，其分佈如圖 2A 所示，故溪流相關樣本合計共採樣 192 個水體樣本。全台飲用水源水體樣本部分，共收集全台各區域 21 個飲用水源水庫地區樣本，其採樣點如圖 2B 所示，冬春夏三季共計 63 個樣本。溫泉水體部分，其採樣溫泉區分佈如圖 3 所示，合計全年度共採樣 124 個溫泉水體樣本。故採樣數量均符合原計畫申請書之要求。

故本研究兩年計畫截至期末報告書撰寫前已完成朴子溪水體共 168 件水體；溪流河川樣本共 81 件；畜牧民生廢水共 87 件；水庫水體樣本共 139 件；溫泉樣本 200 件及日月潭樣本 26 件。

2. 自由營生阿米巴原蟲陽性對照組來源

來源為先前發表之台灣第一例棘阿米巴原蟲分離蟲株及台灣第一例福氏奈格里阿米巴原蟲分離蟲株(Tung et al., 2012, Liang et al., 2009)，樣本形式為 Genomic DNA，自由營生阿米巴原蟲的種類：(1) 棘阿米巴原蟲: *Acanthamoeba castellanii* T4 (2) 福氏奈格里阿米巴原蟲: *Naegleria fowleri*. 使用此 DNA 為後續環境檢驗之陽性正控制組樣本。實驗室依生物安全等級 P2 級之標準操作程序(SOP)以及品保品管(QA/QC)流程建立。

3. 梨形鞭毛蟲、角膜條微孢蟲及隱孢子蟲陽性正控制組 DNA 來源與保存

來源為台灣 CDC 寄生蟲實驗室提供之梨形鞭毛蟲、角膜條微孢蟲及隱孢子蟲之基因體 DNA，保存方式以-20 度 C 冰箱冷凍保存，實驗用途以目標基因之 TA 克隆技術保存並定量，以用於後續環境檢驗之陽性正控制組。其中角膜條微孢蟲樣本來源為游泳池感染病患分離，本研究取得為其基因體 DNA，並將其克隆後進行檢驗方法改善之研究。

4. 環境水樣棘狀阿米巴原蟲及福氏奈格里阿米巴原蟲純化及增殖方法之評估

(A) 過濾培養法：將環境中採集之 1 L 水體樣本或環境樣本加無菌水沖洗，藉由濾膜過濾後，把濾膜置於無營養之培養基中，利用大腸桿菌當作食物來源，置於 30°C 培養箱中進行培養，再利用高倍顯微鏡觀察其型態，來判斷是否有阿米巴原蟲存在。

(B) 離心濃縮培養法：將 50 mL 環境樣本的離心濃縮後，去除上清液，留下之部份液體與沉澱物再均勻混合，吸取濃縮液並注射至塗有大腸桿菌的無營養培養基上，置於 32°C 或 37°C 培養箱中進行培養。

5. 環境水體中自由營生阿米巴原蟲 DNA 萃取方式之比較與改進

DNA 抽取方法測試 (Kit 來源:Qiagen 及廣亮)

A. 水體過濾、流洗、離心濃縮後，直接抽取 DNA(直接濃縮法)。

B. 水體過濾濃縮後，以 NNA 培養液添加 E.coli 進行增殖後，再行抽取 DNA(培養法)。

結果以兩種方法同時檢測為最佳方式，故後續研究建議均以兩種方法同時進行。

6. 濃縮環境水體 PCR 抑制物之分析及各類 PCR 方法增幅效果之評估

A. 選擇各類環境水樣做測試(飲用水源水庫、溪流河川原水水體、溫泉水體)。

B. 記錄其濃縮前及濃縮後水體各項物化參數(濁度、導電度、腐質酸濃度等)。

C. 利用 Wizard DNA Clean-Up system 去除核酸粗萃液中的

腐植酸、富啡酸及其他雜質。

- D. 本研究將比較 ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit，ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit 及 ZP02003 MagPurix Viral Nucleic Acid Extraction Kit(廣亮, Qiagen)抽取環境樣本中所有 DNA。其操作程序與原理依序為 (一) 以緩衝液懸浮濃縮樣品。(二) 加入玻璃珠與含腐殖酸吸附劑的緩衝液。(三) 加入裂解液後充分混合，以裂解樣本中的所有生物同時游離 DNA。(四) 加入沉澱劑，離心後取得含 DNA 之上清液後，混入異丙醇以沉澱 DNA。(五) DNA 以二次水回溶後，加入緩衝液並離心以進一步去除殘餘腐殖酸等 PCR 抑制物，再於上清液中加入乙醇後，利用純化管柱吸附並漂洗 DNA，以去除蛋白質或鹽類。沖提乾燥後即獲得高純度之 DNA。
- E. 以棘阿米巴原蟲作為對照組，於濃縮水體樣本添加不同數量之棘阿米巴原蟲，進行 DNA 萃取，測試其 PCR 呈陽性反應之棘阿米巴原蟲最低偵測極限。
- F. 於經濃縮、DNA 萃取處理之樣品，添加不同劑量之棘狀阿米巴及福氏奈格里阿米巴原蟲 DNA，測試其 PCR 呈陽性反應之最低偵測極限。
- G. 對濃縮環境水體進行 PCR 及 QPCR 實驗，針對主要干擾因子濃度及其棘狀阿米巴及福氏奈格里阿米巴原蟲最低偵測極限之相關性，進行比較、整理。
- H. 整體 PCR 實驗之最佳操作流程
- (1) 在小離心管(Eppendorf)中加入 1-30 μ l 的 DNA Template，並於冰上加入下列試劑：Forward Primer、Reverse

Primer、dNTP、Taq Buffer、Taq Enzyme 以及二次水。(2) 將樣本放入 PCR 溫度循環控制器。(3) 當 DNA 複製完成後，取出 10 μ l 的樣本跑電泳，判定目標 DNA 是否複製成功。(4) 以 Gradient PCR Machine 進行最佳操作溫度與操作時間之評估，修正整體實驗操作流程達最佳化。

I. 為提升整體 PCR 測試過程之靈敏度將使用 PCR 或 Real-time PCR。若要以不同序列之基因同時確認是否存在同一菌種或作為與其他菌種區分之依據則使用 Multiplex PCR。其實驗流程包括下列三步驟：

- (1) 針對 PCR、Real-time PCR、Multiplex PCR 設計適合使用之引子。
- (2) 找出最佳操作溫度與反應時間控制。
- (3) 修正實驗流程使操作達最佳化。

7. 分子生物檢測法設計與分析

水媒性原蟲之 PCR(引子來源:明欣生物科技公司)

(1) 棘阿米巴原蟲 18S rRNA 引子之 PCR 條件，其中第一段引子同時為型別分析之引子對，針對的 18S 基因設計引子 (primer) 與條件分別如下(Qvarnstrom et al., 2006, Dhivya et al., 2007)：

JDP1 5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3'

JDP2 5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3'

AcantF900 5'-CCC AGA TCG TTT ACC GTG AA-3'

AcantR1100 5'-TAA ATA TTA ATG CCC CCA ACT ATC C-3'

配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、5 μ l DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。反應條件，JDP1, JDP2 以 95°C/30 秒、53°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 35 次循環；AcantF900,

AcantR1100 以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/30 秒為一次循環，進行 35 次循環。其中 JDP 所得 PCR 產物均進行克隆後送定序，所得結果將上傳 NCBI 基因資料庫。

(2) 奈格里阿米巴原蟲 18S rRNA 引子之 PCR 條件

針對的 5.8S rRNA 的 ITS 基因設計引子 (primer) 與條件分別如下 (Sheehan et al., 2003, Michel et al., 2005) :

FW1 5'- GTG AAA ACC TTT TTT CCA TTT ACA -3'
FW2 5'- AAA TAA AAG ATT GAC CAT TTG AAA -3'
ITS-F 5'-CAA AAA GCG ATA TGT AAT GA-3'
ITS-R 5'-TTG ATA TAA AAC TAG CAC TCT AA-3'

配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、5 μ l DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。反應條件，FW1, FW2 以 95°C/30 秒、55°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 35 次循環。ITS-F, ITS-R 以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 35 次循環。其中 ITS 所得 PCR 產物均進行克隆後送定序，所得結果將上傳 NCBI 基因資料庫。

(3) 梨形鞭毛蟲 β -giardin locus 引子之 PCR 條件

梨形鞭毛蟲的檢測方法住要參照 Marco Lalle 等人的兩段式的巢式 PCR 反應方法。使用以下兩對引子放大檢測

外引子對：5' -AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'

5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'

內引子對：5' -CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'

5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'

配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、5 μ l DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水

定量到一定 25 μ l。反應條件，外引子以 95°C/30 秒、65°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 30 次循環。內引子配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、0.5 μ l 外引子 DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。內引子以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 30 次循環 (Feng and Xiao, 2011)。 *Giardia lamblia* 偵測極限為 10 cysts/1L(Kathryn et al.,2007) 以及 3800 cysts/100L(Natalie et al., 2014)。

(4) 隱孢子蟲檢測方法修正為參考 Stensvold 等人 2014 年發表於 Journal of Clinical Microbiology 的引子之 PCR 條件，本計畫選用

外引子對 AL3531 : 5' - ATAGTCTCCGCTGTATTC-3'

AL3534 : 5' - GCAGAGGAACCAGCATC -3'

內引子對 AL3532 : 5' - TCCGCTGTATTCTCAGCC-3'

AL3533 : 5' - GAGATATATCTTGGTGCG -3'

配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、5 μ l DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。反應條件，引子對以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 35 次循環 (Stensvold et al.,2014)。內引子配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、0.5 μ l 外引子 DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。內引子以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 30 次循環。 *Cryptosporidium* 的偵測極限為 20600 cysts/100L(Natalie et al., 2014)。

(5) 微孢子蟲檢驗，有鑑於去年檢驗成效不彰，且過往文獻指出溫泉為角膜條微孢蟲感染風險因子，故本年度針對角膜條微孢蟲設計

nested PCR 方式檢驗，主要參考 Raynaud et al.於 1998 年發表之泛微孢子蟲檢驗引子並結合 Bharathi 等人於 2013 年所發表針對角膜條微孢子蟲檢驗之 PCR 引子(Raynaud et al. 1998; Bharathi et al. 2013)，以提高分子檢驗技術之敏感度，增加水體中微孢子蟲檢出率。而目前已特別針對角膜條微孢子蟲(*Vittaforma corneae*) 建立檢驗技術與評估，並以溫泉水樣已完成實際測試與分析。此外，其他感染性微孢子蟲檢驗方法仍在測試階段，但所有水體仍有使用泛微孢子蟲檢驗引子 V1 gene 引子之 PCR 條件

外引子對 V1 : 5' - ACCAGGTTGATTCTGCC -3'

V1r : 5' - GTGACGGGCGGTGTGTAC -3'

內引子對 VC : 5' - CTACCAAGACAGTGACGGTTGA -3'

VC r : 5' - GGCATCTTTTACTGCTGGA ACT -3'

配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、5 μ l DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。反應條件，引子對以 95°C/30 秒、56°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 35 次循環。內引子配置之溶液為引子量各為 1 μ l、MgCl₂ 0.5 μ l、dNTP 0.5 μ l、0.5 μ l 外引子 DNA 模板、以及 0.1 μ l Taq DNA 聚合酵素，再加二次滅菌水定量到一定 25 μ l。內引子以 95°C/30 秒、52°C/30 秒、72°C/45 秒為一次循環，進行 30 次循環(Raynaud et al. 1998; Bharathi et al. 2013)。

(6)克隆檢驗：

本研究 PCR 產物均經過 T&A 克隆後送定序分析，本研究將 PCR 產物經過電泳切膠純化後利用，T&A clone kit (台灣友和)進行產物克隆與純化，主要步驟如產品說明書所示，本研究使用之勝任細胞為 ECOS Competent Cells，後經過 M13 引子確認後送定序。

(7) 序列分析：

本研究將完成克隆後菌體產物交由明欣科技及基龍米克斯生物科技完成定序，使用 M13F 進行定序。使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列分析，反應條件如下：取適量 RT-PCR 反應產物、1 μ M 反應引子 SR33、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為 10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於 96°C 作用 1 分鐘，之後反應條件為 96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分鐘，共 25 次循環。反應產物純化：為減少反應混合物中游離標記物之干擾，先將定序反應後之產物純化。將定序反應產物 10 μ L 加入等體積的 ddH₂O、60 μ L 的絕對酒精、5 μ L 的 125 mM EDTA，於室溫下靜置 15 分鐘，再以 4000 rpm 離心 30 分鐘；去除上清液後，以 70 % 酒精清洗，4000 rpm 離心 5 分鐘，最後將沉澱物烘乾，再加入 10 μ L Hi-diformamide。基因定序反應：將純化後產物置於 96 °C 作用 2 分鐘後，馬上置於冰上，再放入 ABI 3730 自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autoseqencer) 進行核酸序列分析。

8. 氣候資料收集

氣候資料來源為氣象局從 2015 年 1 月 1 日至 2016 年 5 月 31 日之當日(月)氣候資料。其氣候資料包含：每日降水量(mm)、平均氣溫(°C)、平均相對濕度(%)、日照量(MJ/m²)及日照時數(hr)。本年度統整兩年河川及水庫之棘阿米巴原蟲檢驗結果與氣候變遷因子進行統計圖表探討與邏輯斯迴歸分析。

9. 優勢蟲株與水質指標參數關係分析

本次研究主要針對兩種自由營生阿米巴原蟲(奈格里及棘阿米巴原蟲)與不同來源水質參數進行統計分析，採無母數統計分析方法

Mann-Whitney U 檢定進行致病菌發生與是否受水質指標之影響，指標包含生物性指標（總菌(Heterotrophic plate count, CFU/ml)、大腸桿菌群(Total Coliform, CFU/100ml)、大腸桿菌(E. coli (CFU/100ml))及物理性指標(水溫、酸鹼值、濁度、總懸浮固體、溶氧飽和度、鹽度及溶氧量等)。另外，水質指標系一連續性變動因子，探討區間數值亦為連續性，因此採用皮爾森相關係數(Person's correlation)探討指標消長趨勢與致病菌發生趨勢之相互關係。強降雨事件對優勢蟲株之影響則採用基因型別改變分析，並結合該事件發生時當日之期間累積平均雨量(mm)、採樣水溫及濁度是否會對致病菌的檢測率造成影響。本研究初步探討全台長期氣候因子與優勢蟲株發生之相關性，本年度氣候因子初步篩選氣溫、日照量、日照時數與雨量等進行分析，採當天、3天前之平均氣溫(°C)、平均日照量(MJ/m²)、平均日照時數(hr)、累計日照量、累計日照時數、平均雨量及累積雨量(mm)進行分析。統計方法參採蘇(2005)報告使用之邏輯斯迴歸分析(logistic-regression analysis)，其迴歸公式如下：

$$\text{logit}(p)=\beta_0+\beta_1x$$

β_0 表示 $x=0$ ， $\log(\text{檢出}/\text{無檢出之 odd})$ ；

β_1 表個連續變數(x_1)對該 odd 的貢獻量。

所有統計方法使用 Excel 2016、Paleontological STatistics (PAST) V. 3.14 及 SigmaPlot V.10.0 等軟體進行統計分析。

二、結果與討論

1. 方法學確認

以棘阿米巴原蟲(*Acanthamoeba castellanii*)進行水體濃縮處理後 DNA 純化回收效能之評估，結果如表 2 所示。確認為棘阿米巴陰性的環境水樣檢體，經每個樣本添加 5×10^5 數量的棘阿米巴原蟲後過濾濃縮，進行 DNA 純化回收效能評估分析，比較有無使用 Wizard DNA Clean-Up system 去除水中 PCR 抑制物的差異，每個實驗進行三重複。結果發現使用 Wizard DNA Clean-Up system 去除水中腐植酸等 PCR 抑制物後棘阿米巴 PCR 的半定量實驗結果皆比未去除水中抑制物的結果較佳，且無雜 band 產生。本實驗亦使用 imageJ 軟體分析 PCR 產物濃度，發現使用 Wizard DNA Clean-Up system 處理後樣本間的誤差值較未處理小，故後續實驗均進行此項去除水中 PCR 抑制物的步驟。

本研究亦比較不同的 DNA 萃取方法，發現商業化 DNA 萃取試劑 (ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria Kit) 的回收濃度且純度較高，而以自動核酸萃取儀 MagPurix 48 System 萃取的結果次之，但與前者差異不大，其他如 Trizol 等化學性萃取方法則純度最差，故後續實驗以自動核酸萃取儀分析為主(結果未呈現)。其他自營性阿米巴的檢測方法，如阿米巴培養法與直接濃縮法的評估，結果詳述於後續結果中。

2. 水體中自由營生阿米巴原蟲檢測下限評估

本研究利用培養之棘阿米巴原蟲進行水體濃縮回收檢測評估其偵測下限，本研究將培養之棘阿米巴原蟲以不同濃度分別加入 1L 的棘阿米巴原蟲陰性水體(濃度分別為:無添加、 10^{-10} 共 7 個樣本)，結果如圖 5 所示，在無添加的水體中進行棘阿米巴 PCR 檢驗為無檢出，而水體中添加 10 隻棘阿米巴原蟲水體並未呈現陽性反應，而添加 100

隻棘阿米巴原蟲則呈現陽性反應，故本研究進行原蟲水體濃縮檢測的偵測下限為 100 cells/L(圖 5)。 *Giardia lamblia* 偵測極限為 10 cysts/1L(Kathryn et al.,2007) 以及 3800 cysts/100L(Natalie et al., 2014)。 *Cryptosporidium* 的偵測極限為 20600 cysts/100L(Natalie et al., 2014)。 *Microsporidia* 並無文獻指出其偵測極限，但過往研究均需採集 20-100L 水體方能檢測。

3. 角膜條微孢蟲檢驗方法改善結果

根據台北榮總檢驗之微孢子蟲角膜炎病患分析結果發現全為角膜條微孢蟲(*V. corneae*)感染，且從病患生活習性發現溫泉活動為其高風險因子，但從去年檢驗結果發現溫泉或其他水體無此病原體存在，且其他水體中微孢子蟲檢驗陽性率亦偏低，與過往文獻有較大差異。根據過往進行水體微孢子蟲檢驗發現須採用大量水體濃縮，耗時且耗經費(Sandra Fournier et al.,2000 ; Fernando Izquierdo et al. , 2011)，故本研究期望從分子檢驗方法改善，目前已完成角膜條微孢蟲檢驗方法之建立與評估。圖6所呈現的為利用將角膜條微孢蟲常用原始常片段PCR進行合成Plasmid DNA後，利用克隆技術放大回收Plasmid回推樣本濃度後進行角膜條微孢蟲常用PCR檢驗與本研究改善之PCR檢驗之偵測極限實驗。顯示一般常用之微孢子蟲PCR(Raynaud et al.,1998)僅可偵測濃度高於 10^5 copies/ μ L之樣本;使用針對角膜條微孢蟲設計之PCR方法(Bharathi et al.,2013)僅可偵測濃度高於 10^4 copies/ μ L之樣本，雖較傳統使用方法提升1次方，但應用於本研究水體仍顯示樣本均為陰性反應。故本研究結合兩件PCR方法建立nest PCR來探討是否可更有效提升敏感度，結果顯示可以偵測濃度高於1 copies/ μ L之樣本，有效提升偵測極限約4次方。

4. 外在污染之原蟲(微孢子蟲、梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲)於不同水體之

分析

(1) 溫泉水體中外在污染之原蟲檢出率

104 年度，溫泉水體中外在污染之原蟲均未檢出，而 105 年度不同水體來源之致病性原蟲檢出率如表 3 所示，其中溫泉部分本年度冬季為全台溫泉，冬季為溫泉活動之旺季，後續因各地衛生局採檢頻率與作業關係，故本研究春季及夏季則著重於北部溫泉檢驗(並增加烏來溫泉檢驗)，目前檢驗結果顯示溫泉水體中以傳統泛微孢子蟲檢驗方法未檢出微孢子蟲、同時亦未檢出梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲，結果與前一年度結果相同。而先前文獻指出溫泉活動為角膜條微孢蟲 (*Vittaforma corneae*) 眼疾感染之重要危險因子，故本年度進行了方法學探討與改善，建立新方法可使用小體積水體濃縮檢測角膜條微孢蟲，已於前述章節顯示其改善程度。實際用於本年度檢測結果發現第一季(冬季)全台溫泉水體角膜條微孢蟲檢出率為 20%，結果如表 4 所示，而以第一季結果顯示，檢出率較高在東部溫泉區，而第二季(春季)針對北部溫泉檢驗亦有 23.81% 檢出率(表 3)，跟第一季北部溫泉檢出結果相當，故在北部溫泉活動需更注意此類病原體，先前的台灣地區進行微孢蟲角膜炎感染病患之研究亦指出這些病患於北部區域有經常性泡湯行為，本研究亦提供環境致病菌存在情形給予臨床研究之參考，溫泉活動是會有眼睛接觸之娛樂活動，故因更重視溫泉地區角膜條微孢蟲存在情形，才可防止此類疾病之發生。在不同使用設施亦有不同檢出率，結果如表 5 所示，顯示在冷泉池與泡腳池檢出率較高，而大眾池檢出率與總體檢出率相當。然而本次樣本全部均有經過克隆送定序確認，並將結果與 NCBI 資料庫樣本進行繪製親源分析演化樹，結果於後續章節呈現。

(2) 溫泉中角膜條微孢蟲與水質指標相關性分析

本研究將冬季溫泉樣本之水質指標與角膜條微孢蟲檢出進行統計分析，本研究使用 Mann-Whitney U test 檢定，結果如表 6 所示，其中角膜條微孢蟲檢出率與總菌落數有顯著相關，顯示於總菌落數較高之水體較易檢出角膜條微孢蟲，從先前研究指出角膜條微孢蟲病患感染與接觸髒污水體或泥水有關(Bharathi et al. 2013, Joseph et al. 2006, Kwok et al. 2013, Sharma et al. 2011, Tan et al. 2013)，故本研究提供統計相關性證據支持臨床感染研究之風險探討。而溫泉區有分室內或室外之環境，根據先前研究均指出此類疾病感染之因子與戶外環境接觸有關，故本研究亦針對此次採樣之環境進行統計分析，分室內外與角膜條微孢蟲存在情形進行統計檢定，室內外環境主要在於是否與戶外環境有暴露風險，例如室內以湯屋或個人池為主，戶外以大眾池或源頭等為主，但部分大眾池位於室內封閉環境，本研究仍認定為室內環境，結果如表 7 所示，顯示大多數角膜條微孢蟲陽性水體均存在於室外環境或土壤暴露，故針對戶外環境之溫泉水體更應注意此類病原體之存在情形。

(3) 溫泉中角膜條微孢蟲與參考蟲株之基因親源演化分析

15 個角膜條微孢蟲陽性樣本的親源演化結果如圖 7 所示，總共有兩個主要的角膜條微孢蟲集群分別為 cluster A 及 B。此外有 2 個陽性樣本與其他致病性微孢子蟲較為相近，本研究稱為兩個外集群。其中 cluster A 包含了 5 個陽性樣本，分別來自東部與北部溫泉區，這個集群包含了印度地區眼疾感染相關之角膜條微孢蟲基因型與台灣地區病患，顯示這個集群之角膜條微孢蟲與眼疾感染有關，是值得關注的部分，本結果亦提供先前的台灣角膜炎臨床研究之環境致病菌存在之依據。集群 B 則包含了 6 個水樣及一個來自葡萄牙多數腹瀉病患分離之微孢蟲，稱為似角膜微孢蟲基因型，則這 6 個溫泉水樣分別來自於全

台地區溫泉，而以基因型探討，此類角膜條微孢蟲會影響則須注意腹瀉相關疾病，故顯示仍有疾病感染高度風險，尤其如以溫泉水為飲用時需更加注意。則集群 C 剛好親源性介於集群 B 與 *Encephalitozoon spp.* 之間，不論是集群 B 或者 *Encephalitozoon spp.* 均為腹瀉感染相關之微孢蟲，故如先前所述須注意此類病原體於溫泉水中之風險。然而樣本 D2-o and C1-i 分別同源性相似於 *Encephalitozoon spp.* 及 *Pleistophora spp.*，而 *Pleistophora spp.* 亦屬於眼疾相關之微孢蟲，故仍須注意此類水體之接觸。發現上述之結果亦有可能因為引子專一性不足導致 PCR 產物錯誤，然而針對此問題本研究進行序列探討發現，先前文獻已有針對此引子進行專一性探討，針對 *Encephalitozoon spp.* 及 *Pleistophora spp.* 等其他微孢蟲此引子是無法放大，而本研究針對序列進行分析發現如圖 8 所示，此次發現此兩樣本應屬新的微孢蟲種類，但因目前尚無相關抗體可從水體中分離，故仍須靠大量臨床檢驗與水體檢驗來佐證之。圖 8 中顯示只有角膜條微孢蟲與此兩樣本具有引子黏合區，其他種類之微孢蟲有較大之序列差異，故引子專一性並無問題。

(4) 朴子溪、日月潭區域、溪流及水庫水體中外在污染原蟲檢出率

104 年度朴子溪流域冬、春、夏三個季節的總體河川監測，總共採取 72 個河川水樣檢體，進行隱孢子蟲、梨形鞭毛蟲及微孢子蟲檢測。隱孢子蟲的直接濃縮法檢出率為 0% (0/72)；梨形鞭毛蟲的直接濃縮法檢出率為 1.4% (1/72)；微孢子蟲的直接濃縮法檢出率為 2.8% (2/72)。

而其他溪流四季的總體水體樣本監測結果為隱孢子蟲直接濃縮法的檢出率為 2.1% (1/48)；梨形鞭毛蟲直接濃縮法的檢出率為 2.1% (1/48)；微孢子蟲直接濃縮法的檢出率為 4.2% (2/48)。

隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲均由糞便污染而傳播，若水體中發現，則顯示水體短期間內遭到糞便之污染，故可把此兩類原蟲當為水體之受外在污染之指標，來探討水體是否遭受糞便污染。朴子溪目前只有一季中的一個樣本檢出梨形鞭毛蟲，而在其他溪流亦發現只有一個溪流樣本有隱孢子蟲檢出，另 1 個溪流有梨形鞭毛蟲檢出，顯示台灣溪流是有遭受糞便污染的問題，需長期監控。國外亦常發生因梨形鞭毛蟲或隱孢子蟲引起大規模群聚感染事件，其主要均是飲用到遭受污染之水源，故可長期監控以防止疫情發生。因梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲皆可引起人畜共同疾病，本研究後續將進二者的型別分析以釐清來源，並其據以找出污染河川的來源。微孢子蟲因物種繁多，目前使用之引子主要可偵測到以下微孢子蟲型別：*Enterocytozoon spp.* (*E. bienensi*、*E. cuniculi*、*E. hellem*)、*Trachipleistophora anthropophthera* 及 *Pseudoloma neurophilia* 等，但無法有效偵測與人類相關致病株如：*Vittaforma corneae*，因此本研究將持續進行其他分析，故期望於第二年度計畫將改進引子增加人類致病株的檢出能力，以分析微孢子蟲在台灣的環境背景值與重要性。目前引子檢出的微孢子蟲均為 *Pseudoloma neurophilia*，此種微孢子蟲目前並無相關研究指出與人類疾病有關，但有可能影響魚類。

105 年度朴子溪與溪流水體個別檢出率如表 3 所示，其中朴子溪流流域冬、春、夏三個季節的總體河川監測，總共採取 72 個河川水樣檢體，進行自由營生阿米巴原蟲、隱孢子蟲、梨形鞭毛蟲及微孢子蟲(含角膜條微孢蟲)檢測。其中微孢子蟲(泛微孢子蟲檢驗方法)、梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲均未檢出。

105 年度日月潭區域合計兩季 26 個水樣，微孢子蟲(泛微孢子蟲檢驗方法)、梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲均未檢出。角膜條微孢蟲則待檢

驗中，目前初步 PCR 結果第一季有 50% 呈現陽性反應，須待定序確認。

隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲均由糞便污染而傳播，若水體中發現，則顯示水體短期間內遭到糞便之污染，故可把此兩類原蟲當為水體之受外在污染之指標，來探討水體是否遭受糞便污染。然而本年度卻均未檢出。國外亦常發生因梨形鞭毛蟲或隱孢子蟲引起大規模群聚感染事件，其主要均是飲用到遭受污染之水源，故可長期監控以防止疫情發生。因梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲皆可引起人畜共同疾病，但本年度亦針對朴子溪上游相關畜牧民生廢水進行此類病原體檢測，其結果於後續章節呈現。微孢子蟲因物種繁多，目前使用之引子主要可偵測多數微孢子蟲，但因其偵測極限較差，故先前研究指出需大量水體濃縮方可檢測，故本年度除了使用原本引子偵測外，針對角膜條微孢蟲(*V. corneae*)進行檢驗，結果如表 3 顯示朴子溪冬季檢出率為 100%，春季檢出率為 70.83%。在水庫與溪流部分檢出率則均為 90% 左右，此類樣本在電泳時發現有些水體會出現兩個相近位置之 PCR 產物，如圖 8 所示，目前樣本部分已定序完成，其大部分基因相似度與前述溫泉親源分析集群 B 較為相似，少部分與集群 A 相似，亦有部分檢體與外集群相似，但因數量較多且須經過克隆後定序，故此部分資料無法於本次結果呈現，但仍可了解，溪流與朴子溪流域遭受微孢蟲的孢子污染是值得關注的問題，待定序結果完成將提供疾病管制署相關單位參考之。

(5) 朴子河流域相關畜牧民生廢水中外在污染原蟲檢出率

如表 3 所示，於 105 年度冬春夏三季之畜牧民生廢水採樣，冬季隱孢子蟲檢驗為未檢出，然而春夏兩季均檢出率為 3.45%，顯示各有一個水體檢出陽性。而梨形鞭毛蟲於冬季檢體有一個樣本檢出陽性，

故檢出率為 3.45%，春夏兩季則未檢出。

其中樣本均送定序後發現，梨形鞭毛蟲型別為 *Giardia lamblia*，此病原體常見於人類原蟲類腹瀉中，且台灣先前研究指出人類梨形鞭毛蟲感染症主要病原體型別為 *Giardia lamblia*，故此類病原體對於人體是有感染風險，且本次檢驗陽性點 G032 為靠近朴子市區畜牧場外排放水體，此處水體會連結朴子溪，且較靠近下游水產貝類養殖區，雖朴子溪水並未檢出，可能受到溪水稀釋與採水量濃縮較少因素影響，但在此類水體中檢測出仍對環境污染有所影響，需發展更敏感之檢測方法或更有利於此類病原體濃縮之方法。

隱孢子蟲兩樣本經定序 NCBI 比對後發現，其均為型別為 *Cryptosporidium parvum*，此型別為人類隱孢子蟲感染症主要之感染型別，且對人類造成疾病只需少許 1-10 個蟲株就可引起腹瀉症狀，且為急性腹瀉，故其存在性對於環境污染與疾病預防是高度風險。根據 Kebljian(1995)的調查，在美國約有 4.5%的泳池可檢測出隱孢子蟲，單單 1995 年美國就有五件隱孢子蟲症感染與游泳池有關。此兩水樣點為 G261 及 GM16，G261 為新港地區畜牧場外排放廢水故污染來源可能是其豢養之動物，而 GM16 為群體農田與畜牧排放廢水溝渠，此溝渠水流量大且會直接排放入朴子溪，雖朴子溪水未檢出，但此類病原體排放至溪水，仍屬需有關農牧及衛生單位注意，本研究建議針對畜牧排放廢水進行長期監控研究，以瞭解此類病原體環境污染之情形，尤其隱孢子蟲會造成群聚感染，雖近些年台灣並未發生此類病原體群聚感染，但因此類感染所需蟲體量較低，故值得後續探討監控之。

然而目前畜牧廢水排在環保法規上僅考量化學需氧量(COD)、生化需氧量(OD)及懸浮固體(SS)三種指標，並無病原體、大腸桿菌

數或總菌落數等微生物相關指標。主要法規如下面兩點：依據「水污染防治法」第二條第一項規定，位於自來水水質水量保護區，養豬 10 頭以上、養牛 40 頭，及非位於自來水水質水量保護區養豬 20 頭以上、養牛 50 頭之畜牧場，為「水污染防治法」所稱之事業；依據「水污染防治法」第十三、十八條及「水污染防治措施及檢測申報管理辦法」第五十六、五十七、五十八條規定，養豬 2,000 頭、養牛 250 頭及漁牧綜合經營養殖面積達 0.5 公頃以上之畜牧場，應檢具水污染防治措施計畫，然目前很多業者未必位於自來水水源保護區、非豬或牛等豢養動物或其養殖數量較少，均無更嚴謹之法規規範，例如朴子溪非自來水源保護區，但其下游為台灣重要水產養殖區，故有法規上之缺失，需進一步研究探討其影響。而近年農委會相關輔導一些農牧產業進行畜牧業廢水處理回灌農地可減少廢水排放量，但是否會因此影響食品安全，需後續研究持續關注，故本研究建議相關單位能針對此類議題進行監控與評估。

5. 自由營生阿米巴原蟲於不同水體之分析

(1) 溫泉水體中自由營生阿米巴原蟲檢出率

105 年度棘阿米巴原蟲於冬季全台溫泉共 62 個水體樣本中檢出率僅 1.6%，而春及夏季北部溫泉檢出率亦約 5% 左右，全年度僅有 3.9% 的檢出率明顯較前一年度及阿米巴原蟲檢出率 8% 左右更低許多，且比先前研究發現台灣地區溫泉棘阿米巴原蟲檢出率約 21.1% 低許多 (Huang SW and Hsu BM, 2010)，顯示近幾年溫泉區棘阿米巴原蟲不在具有生存之優勢，而目前溫泉水體中優勢之自由營生阿米巴原蟲為何，期望未來透過 18s 自由營生阿米巴原蟲 NGS 分析探討之。過去的研究發現奈格里阿米巴原蟲較其他自由營生阿米巴原蟲耐高溫，且某有些型別特別喜歡生存在高溫環境，因此溫泉水體應更注意奈格里

阿米巴原蟲的存在，尤其是台灣曾發生因使用溫泉而感染奈格福式阿米巴原蟲造成死亡的案例，並在溫泉水體中檢測出同型蟲株，溫泉水的衛生品質，需要更多的把關。本研究前一年度奈格里阿米巴原蟲溫泉檢出率為 29%，而本年度為 10.9%，相較於前一年度明顯下降，是否與氣候變遷有關待後續資料分析呈現，但仍明顯高於棘阿米巴原蟲，顯示奈格里阿米巴原蟲偏好存活於較高溫的水體環境，先前 Sheehan 等人於 2002 年進行美國溫泉水體奈格里阿米巴原蟲檢出率高達 43.5%，而 2010 年 Badirzadeh 等人亦發現伊朗地區溫泉水體奈格里阿米巴原蟲亦高達 39.3%，而棘阿米巴原蟲檢出率僅 3.9%，顯示各個地區溫泉水體可能均以奈格里阿米巴原蟲為自由營生阿米巴原蟲的優勢種類。與本研究較相似的區域為 Amorn 等人於 2005 年於泰國溫泉區的調查，奈格里阿米巴原蟲檢出率為 35%，棘阿米巴原蟲為 13.2%。氣候上來說，泰國與台灣有某些季節相似。未來可從採樣前氣候或氣溫差異上來進行探討分析，及針對分離的蟲株進行嗜熱性測試，以了解是否因嗜熱性而呈現此結果。

(2) 朴子溪、日月潭區域、溪流水體中自由營生阿米巴原蟲檢出率

於朴子溪流域中，104 年度，棘阿米巴原蟲以直接過濾濃縮法後之檢出率為 0% (0/72)，而在培養後在做檢測的檢出率則為 33.3% (24/72)，總檢出率為 33.3% (24/72)；同樣的奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法檢出率為 1.4% (1/72)，而培養法檢出率為 30.6% (22/72)，總檢出率為 30.6%(22/72)。

105 年度，棘阿米巴原蟲以直接過濾濃縮法後之檢出率為 2.7% (2/72)，而在培養後在做檢測的檢出率則為 33.3% (24/72)，總檢出率為 36.1% (26/72)；同樣的奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法檢出率為 0% (0/72)，而培養法檢出率為 29.2% (21/72)，總檢出率為

29.2%(21/72)。其中夏季水體因尚未全部完成克隆定序，故後續型別分析與統計檢定並無納入。前一年度棘阿米巴原蟲總檢出率為 33.3%(24/72)，而奈格里阿米巴原蟲總檢出率為 30.6%(22/72)。本年度檢驗結果與去年度結果相近，顯示在前三季統整檢出率於朴子河流域並無明顯改變。

本年度新增 13 處日月潭檢驗，兩季合計 26 個水樣，僅培養法檢出兩例棘阿米巴原蟲，並無奈格里阿米巴原蟲，分別為冬季的 5 號水樣及秋季的 5 號水樣，基因型別均為 T4 基因型棘阿米巴原蟲。此結果相當值得重視，T4 為感染案例最多之基因型值得重視，此外兩季均在此處檢出，顯示該處長期有 T4 基因型棘阿米巴原蟲存在，所幸此處位於向山風景區附近，與人為接觸機率較低，但仍靠近環湖腳踏車步道，值得關注此處之用水安全，尤其是否為泳渡日月潭會經過之地點仍須注意，但此僅為兩次檢測結果，期望未來可長期監控，尤其日月潭每年均有泳渡日月潭之活動，故須更加注意此處水域自由營生阿米巴原蟲之存在情形，本研究建議相關單位重視此議題。

104 年度中其他溪流四季的總體水體樣本監測結果為棘阿米巴原蟲直接過濾濃縮法檢出率為 10.4% (5/48)，培養法為 27.1% (13/48)，總檢出率為 35.4% (17/48)；奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法為 2.1% (1/48)，培養法為 14.6% (7/48)，總檢出率為 16.7% (8/48)。

105 年度中其他溪流三季的總體水體樣本監測結果為棘阿米巴原蟲直接過濾濃縮法檢出率為 15.1% (5/33)，培養法為 30.3% (10/33)，總檢出率為 39.4% (13/33)；奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法為 3% (1/33)，培養法為 81.8% (27/33)，總檢出率為 81.8% (27/33)。前一年度棘阿米巴原蟲總檢出率為 35.4% (17/48)，本年度棘阿米巴原蟲檢驗結果與前一年度相似，但奈格里阿米巴原蟲檢出率今年度高出前一年

度(16.7%)許多，顯示今年度溪流環境可能與去年度有所差異，後續將進行統計檢定探討。

從上述 104-105 年度結果發現不論朴子溪單一流域或多條溪流的綜合觀察，棘阿米巴原蟲的檢出率是相近，且都高達 30% 以上，顯見其普遍存在於河川溪流中，對於氣候及環境變遷議題，棘阿米巴原蟲可作為環境變遷調查的監測標的，可在水體環境發生變遷時，用以分析變遷與棘阿米巴原蟲數量及種類變化的關係。與國外的研究比較，台灣溪流中棘阿米巴原蟲的檢出率皆高於 Corsaro 等人於 2010 年所做的 5.6% 法國溪流檢出率及 Ettinger 等人於 2003 年做的 9.6% 美國溪流檢出率，此差異是否來自於溪流型態或國家氣候型態差別是值得深入探討；根據 Dennis 等人 1985 年的研究指出，當雨季節時，雨水會將土壤中之自由營生阿米巴原蟲沖出帶入水體 (Dennis and Gayle, 1985)，台灣屬降雨豐沛地區，可能持續將土壤中之自由營生阿米巴原蟲帶入河川中，故有較高檢出率，本年度同時進行氣候因子對棘阿米巴原蟲檢出影響統計圖表分析於後續結果與討論中。然而棘阿米巴原蟲某些型別屬於對人體有感染風險之蟲株，因此檢出率較高仍具有較高度感染風險，是值得各衛生單位注意之議題。此外，本年度朴子溪水體檢出之棘阿米巴原蟲中，大多為致病風險較高之基因型 (18/26)。

而奈格里阿米巴原蟲在朴子溪的檢出率亦高達 30% 以上與棘阿米巴原蟲相當，而本年度綜合溪流的檢出率高達 81.8%，高於棘阿米巴原蟲，結果與去年呈現相當迥異之現象。而參考先前研究指出法國溪流中奈格里阿米巴原蟲的檢出率 9.6% 而美國檢出率為 46% 相比，顯示奈格里阿米巴原蟲分布確有地域的差別，而綜合先前台灣之研究發現，本年度溪流之高檢出在過往是不常見的，這是值得深入探討與

氣候相關之議題。然而，但此類奈格里阿米巴原蟲中只有福氏奈格里阿米巴原蟲(*Naegleria fowleri*)確認會感染人類引起疾病，其他型別與人類疾病較無明顯證據顯示相關，本研究目前雖未偵測到福氏奈格里阿米巴原蟲，但不可掉以輕心，福氏奈格里阿米巴原蟲仍可能因為在環境中的蟲量遠少於其他奈格里阿米巴原蟲而被遮蔽，無法檢驗出來。同時，奈格里阿米巴原蟲在環境中的分佈變異較大，可與棘阿米巴原蟲比較，來探討氣候環境變遷之影響。

(3) 飲用水源水庫水體中自由營生阿米巴原蟲檢出率

104 年度四個季節的水庫飲用水源水體樣本監測結果發現棘阿米巴原蟲檢出率在直接濃縮法為 9.2% (7/76)，培養法為 34.2% (26/76)，總檢出率為 36.8% (28/76)；奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法檢出率為 1.3% (1/76)，培養法檢出率為 10.5% (8/76)，總檢出率為 11.8% (9/76)。

105 年度中三個季節的水庫水源水體樣本監測結果發現棘阿米巴原蟲檢出率在直接濃縮法為 9.2% (11/57)，培養法為 34.2% (15/57)，總檢出率為 36.8% (20/57)；奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法檢出率為 0% (0/38)，培養法檢出率為 18.4% (7/38)，總檢出率為 18.4% (7/38)。

全年度棘阿米巴原蟲檢出率高達 36.8%，此結果與先前溪流結果相似，顯示在台灣地區不論水庫水源或溪流水體中棘阿米巴原蟲是廣泛存在的，對比 Leiva 等人於 2007 在尼加拉瓜及 Kilvigton 等人於英國針對飲用水源所作結果是相似的，且與台灣地區 2014 年針對同樣水庫水源進行分析結果相似。奈格里阿米巴原蟲檢驗與前一年度較高，但在飲用水源水庫中的檢出率均低於棘阿米巴原蟲，顯示在一般水庫水源中以棘阿米巴原蟲為主要存在之自由營生阿米巴原蟲。方法學方面如同先前溪流水樣自由營生阿米巴原蟲檢出率一樣，均是以培養法為最佳檢出方法，但培養法易受其他病原體影響及人為操作誤

差，故仍建議使用兩種方法同時分析比較可獲得較完整之數據。

此外，文獻指出若水體停滯不動，易於表層覆著生物膜，膜上含有許多革蘭氏陰性菌，這些細菌會透過自產黏多糖使生物膜更牢固，從而更容易積聚菌落 (Preston et al., 2001)，會提升感染其他微生物的機率。Lauren 作者團隊收集了美國家庭用水，針對棘阿米巴原蟲和自由營生阿米巴原蟲之存在進行研究探討，在 467 戶家庭中檢測出自由營生阿米巴原蟲的機率 79.0%，其中棘阿米巴原蟲之檢出率更高達 51.0%。除此之外，*Naegleria*、*Hartmannella* 和 *Vahlkampfia* 也從家庭用水被檢測出來。同研究指出，棘阿米巴原蟲普遍存在於淋浴或蓮蓬頭水中，其型別為 *A. castellanii*、*A. polyphaga* 和 *A. hatchetti*，這些物種會造成人類角膜炎。此外，研究結果亦顯示美國的自來水消毒管理系統，不足以殺死棘阿米巴原蟲滋養體或胞囊體，而且自來水儲存槽可能會成為這些微生物生長的溫床而造成人類健康的威脅 (Lauren et al., 2011)。

如以型別分析與人類致病風險相關蟲株，主要有 6 類，佔檢出率的 78%，顯示在此朴子溪流區域活動仍需注意其感染風險，特別是下游是台灣重要的文蛤牡蠣養殖區，當水體嗆入或有傷口都可能造成棘阿米巴原蟲感染，嚴重可導致肉芽腫性腦膜炎(GAE)，為一種罕見卻致命的神經系統疾病(Marciano-Cabral and Guy Cabral, 2003)，這類病原體會進入體內經呼吸道和侵入肺泡血管，最後穿過血腦屏障進入中樞神經系統(Siddiqui R and Khan NA.,2012)。棘阿米巴原蟲是環境中最常見的自由營生阿米巴原蟲(Page,1988)，而其存在的高含量與環境水體的污染與高豐度的細菌量有關(Bonilla et al., 2009)，致病性棘阿米巴原蟲的高檢出率顯示朴子溪流域感染肉芽腫性腦膜炎(GAE)或是棘阿米巴原蟲角膜炎(AK)有極高的風險，並可仍顯示此區域有高度

細菌污染風險，故在預防上需做好預防措施。

(4) 長時間水庫河川、北部溫泉及朴子溪樣本中自由營生阿米巴原蟲檢出率

本研究將過往台灣環境中檢測自由營生阿米巴原蟲的參考文獻(來源:中正大學許昺慕教授實驗室)，結合本年度與前一年度河川與水庫阿米巴原蟲檢出率繪製成季節與檢出率時間圖，圖 10 為河川樣本阿米巴原蟲檢出率季節折線圖，圖 11 為水庫樣本阿米巴原蟲檢出率季節折線圖，圖 12 為朴子溪阿米巴原蟲檢出率季節折線圖，圖 13 為北部溫泉區阿米巴原蟲檢出率季節折線圖。從這些資料可以發現兩種自由營生阿米巴原蟲於不同水體間的各自消長與季節相關，從圖 10 的河川樣本可以發現大多數季節檢出率以棘阿米巴原蟲為主，棘阿米巴原蟲從 2013 年起檢出率高峰大多落在夏秋兩季，然後以冬季為檢出率較低季節；奈格里阿米巴原蟲於 2015 年前亦以夏秋兩季為檢出率高峰時期，但 2015 年夏季檢出率為 0% 後，從 2015 年秋季起檢出率持續上升，且 2016 年冬春兩季檢出率明顯高達 69% 的檢出率，綜合圖 11 的水庫樣本，雖然 2016 年冬春兩季未有如此高之檢出率但結果亦有相同趨勢現象，顯示奈格里阿米巴原蟲於 2015 年夏季遭受不明原因之影響後，整體存在情形已受到影響，故本研究推測奈格里阿米巴原蟲亦受到氣候影響或水質改變影響，後續將針對奈格里阿米巴原蟲檢出情形與氣候因子進行氣候變遷影響分析，及與水質參數進行統計分析，以了解是否奈格里阿米巴原蟲易受氣候與水質參數之影響。而棘阿米巴原蟲相對奈格里較為穩定，不論在河川或水庫樣本檢出率高峰大多落在夏季，所以棘阿米巴原蟲存在情形與季節變化較為相關，但可能較不易受氣候或水質影響而有大规模變遷事件發生。然而從圖 12 的朴子溪流域季節變化上棘阿米巴原蟲夏秋季相對檢出率

仍較高，但 2016 年冬季檢出率較為特別，但因與今年年初氣溫相對較前一年度溫暖導致，下一章節將與平均氣溫及降雨量進行探討分析，奈格里阿米巴原蟲在朴子河流域則呈現逐年逐季上升趨勢，尤其 2016 年冬季檢出率明顯上升甚至高過棘阿米巴原蟲檢出率，顯示近些年奈格里阿米巴原蟲在環境中有變多趨勢。

從圖 13 所顯示的北部溫泉區自由營生阿米巴原蟲季節檢出率情形結果顯示在春冬兩季以奈格里阿米巴原蟲為主要溫泉水體中自由營生阿米巴原蟲種類，而夏秋兩季仍以棘阿米巴原蟲為主，故在不同季節下這兩類自由營生阿米巴原蟲消長與季節有相關性。但因 2015 年夏季與秋季樣本數較少，故可能會產生樣本偏差，整體而言溫泉水體中檢出數量較多仍以奈格里阿米巴原蟲為主，與其他水環境較不一樣，期望能持續監控北部溫泉中自由營生阿米巴原蟲存在情形變化，以探討近幾年溫泉頻繁使用下對其生態與存在情形之改變。

(5) 長時間水庫河川樣本中自由營生阿米巴原蟲檢出率與月降雨量及氣溫相關性分析

本研究將不同季節自由營生阿米巴原蟲檢出情形與全台季平均氣溫與季累積降雨量進行圖表繪製，從圖表分析中探討檢出率與季節之相關性。圖 14 及 15 分別為季平均氣溫與累積降雨量及水庫及河川中棘阿米巴原蟲與奈格里阿米巴原蟲檢出率相關性分析圖，其中季平均氣溫與累積雨量參考自氣象局全台主要區域之平均數，主要區域定義為取水庫河川較多之城市如下：台北、台中、南投、嘉義、台南、高雄、花蓮及宜蘭所得平均氣溫。圖 16 及 17 分別為季平均氣溫與季累積降雨量及朴子河流域中棘阿米巴原蟲與奈格里阿米巴原蟲檢出率相關性分析圖，其中季平均氣溫與累積雨量參考自氣象局嘉義朴子地區氣象資料。圖 14 上圖顯示棘阿米巴原蟲檢出率與氣溫呈現相關

性，雖經相關性檢定結果顯示並無顯著相關，但從圖表可以了解是互有一致趨勢存在，圖 14 下圖為棘阿米巴原蟲檢出率與降雨量並無明顯相關性，但如將前一季節累積降雨量與下一季檢出率相比則雖相關性統計並無顯著相關但與氣溫結果相似具有一致趨勢存在。

圖 15 上圖中於 2015 年夏季之前奈格里阿米巴原蟲於河川水庫樣本檢出率與季平均氣溫趨勢相似，但 2015 年夏季至 2016 年冬季呈現負相關，而 2016 年春季又迴歸與季平均氣溫趨勢一致，而與季累積降雨量之關係則與棘阿米巴原蟲結果相同，與當季累積降雨量較無相關性，而與前一季節累積降雨量呈現一致趨勢，但統計上仍無顯著性存在，惟 2015 年夏季檢出率仍是特異點，本研究將 2015 年夏季特異點去除進行與前一季累積降雨量相關性分析，結果顯示檢出率與前一季降雨量具有中度顯著相關($R=0.513$, $p=0.03$)，顯示當前一季降雨量較多時，下一季棘阿米巴會有較高檢出率出現，故可透過降雨量的累積預測下一季節所可能呈現之降雨量變化。故後續將針對採樣時間點前與當日氣候因子進行邏輯斯迴歸探討，綜合兩種自由營生阿米巴原蟲可發現棘阿米巴原蟲與氣候季節大尺度數據之間有相關性存在，且較為穩定狀態，然而奈格里阿米巴原蟲易受有變化，較不穩定，本研究假定其與短時間氣候因子有關，奈格里阿米巴原蟲相對較易受到短期間影響而導致檢出率變化，故本研究將進行採樣點短時間數據進行邏輯斯迴歸分析，探討與短期因子相關性。

本研究亦針對單一流域(朴子溪)進行檢出率與流域當地季平均溫度與累積雨量進行相關性分析，從圖 16 所呈現與上述全台溪流與水庫結果相同，及阿米巴原蟲對於氣溫仍呈一致性關係，惟 2016 年冬季朴子溪檢出率與氣溫呈現負相關，而與累積降雨量相關性與全台河川水庫結果相同，與當季累積降雨量無關，但與前一季降雨量呈現呈

一致性關係，雖無顯著差異但 p-value 大多落在 <0.1 區間，而同樣於 2016 年冬季朴子溪一樣呈現不同結果，推測可能與 2016 年冬季相對高溫日數較多有關，2016 年冬季季節型態為暖冬偶有較強烈冷氣團，導致瞬間氣溫下降比前一年度更低溫，但多數時間處於暖冬現象中，而本研究進行採檢時間剛好有多日暖冬時期，平均溫度約 22 度左右，相較前一年度大多時期約 18 甚至 17 度的氣溫相對較高。

然而上述現象於圖 17 所呈現的朴子溪水中奈格里阿米巴原蟲季節檢出率與季平均溫及季累積降雨量相關性圖表中亦有相同現象，2016 年冬季檢出狀態與氣溫及前一季降雨量有明顯迥異之處，但從先前推論奈格里阿米巴原蟲亦受到短期氣候因子影響，故可使用短時間氣候因子資料分析探討之。而奈格里阿米巴原蟲於 2014 年夏季朴子溪檢出率為 0，但從此季後有明顯增加之趨勢，而 2015 年冬季之後檢出率就與季節氣候因子有線性相關。除了前述原因外，與全台溪流與水庫樣本相比，流域樣本亦受到採檢點的水質指標影響，例如出海口鹽度相對內陸溪流採樣點鹽度較高，故本研究亦針對整體溪流水質指標參數與此兩類自由營生阿米巴原蟲進行分析探討，期望釐清自由營生阿米巴原蟲存在情形之差異與水質參數間相關性是否導致全台河川水庫檢驗以棘阿米巴原蟲檢出為主之原因探究。

(6) 朴子河流域兩種自由營生阿米巴原蟲地理分布與季節變化相關分析

本研究將 2015 年夏季至 2016 年春季四個季節的朴子溪各採樣點檢出自由營生阿米巴原蟲型別繪製成地理分布圖(圖 18)，圖中顯示黃色為此採樣點只有棘阿米巴原蟲檢出，綠色為只有奈格里阿米巴原蟲檢出而紅色為此採樣點兩種自由營生阿米巴原蟲均有檢出。從下游採樣點分析，顯示從 2015 年夏季開始以致病型棘阿米巴原蟲(T4)為主，

一直到 2016 年冬季仍是以 T4 基因型為主，但 2016 年春季則只有非致病型棘阿米巴原蟲(T11)，顯示在下游區域棘阿米巴原蟲優勢種的變化。而中上游部分大多以奈格里阿米巴原蟲為主，而中游部分偶有致病型與非致病型棘阿米巴原蟲存在，而 2016 年春季的上游則顯示有較多致病型棘阿米巴原蟲存在，故夏季與冬季之下游致病型棘阿米巴原蟲是否為春季上游致病型棘阿米巴原蟲隨著水流而傳播至此處，是值得後續長期觀察分析。而奈格里阿米巴原蟲在下游處較少發現，可能與下游水質生態不利於奈格里阿米巴原蟲生長有關，將後續進行水質統計檢定分析。

(7) 棘阿米巴原蟲親源演化樹分析

本研究將近兩年檢出棘阿米巴原蟲樣本經過克隆後定序所得 JDP 序列經 Mega7 進行親源演化分析，結果如圖 19 所示，檢出之棘阿米巴原蟲序列分型分析，可以發現所有檢體中，表現量最高的是 T4 型 (約佔 57.6%)，其次依序為 T5 型、T6 型、T3 型、T11 型及 T14 型，比對樣本類型與檢出型別則可以發現，所有的溫泉棘阿米巴原蟲檢測皆為 T4 類型，而 T4 屬於最常見致病類型，在泡湯行為中，易發生嗆入而導致感染棘阿米巴原蟲感染，或因泉水接觸而造成眼部感染，先前也有研究報導指出因泡湯行為而感染 T4 型棘阿米巴原蟲之案例發生。T3 型則發現會造成阿米巴原蟲性角膜炎，T6 型曾發現會感染腦部造成阿米巴原蟲性腦炎，而其他型較為偏環境蟲株，雖無致病性但可能為環境其他致病性細菌的溫床，值得深入探究其胞內菌相。有鑑於環境中存在這麼多樣的棘阿米巴原蟲，但實際上臨床案例仍是偏少，故本研究持續進行將分離之不同型別棘阿米巴原蟲進行與人類宿主細胞共培養，以探討是否環境存在的這些致病性基因型對細胞毒性分析，以期提供更多相關資訊提供未來防治。

(8) 奈格里阿米巴原蟲親源演化樹分析

本研究同樣將近兩年檢出奈格里阿米巴原蟲樣本經過克隆後定序所得 ITS 區間序列經 Mega7 進行親源演化分析，結果如圖 20 所示。其中總共有 7 個型別的奈格里阿米巴原蟲，以 *N. clarki* 為最多樣本蟲株，其次分別為 *N. australiensis*、*N. dobsoni*、*N. fultoni*、*N. amerucana*、*N. pagei* 及 *N. lovaniensis*，雖都非常見致病性奈格里阿米巴-奈格理福氏阿米巴(*N. fowleri*)，但 *N. australiensis* 在小鼠實驗時，對小鼠腦部一樣會造成原發阿米巴性腦膜炎，而其他雖都非致病性奈格里阿米巴，但許多文獻指出 *N. pagei*、*N. clarki* 及 *N. gruberi* 常見胞內有嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)共生，嗜肺性退伍軍人菌會造成退伍軍人症，屬於常見之肺炎感染症，故環境水體中有此類奈格里阿米巴存在相對有較高機會存在嗜肺性退伍軍人菌，這是值得關注的議題。

6. 自由營生阿米巴原蟲於不同水體中檢出率與水質參數統計分析

(1) 河川水庫水體中自由營生阿米巴原蟲與其水質參數相關性分析

於河川水庫樣本中進行統計 U 檢定(表 8 及表 9)，結果顯示棘阿米巴原蟲僅對溶氧量及大腸桿菌群有顯著相關($p < 0.05$)，棘阿米巴原蟲存在與大腸桿菌群之間關係為大腸桿菌群數較少相對較易有棘阿米巴原蟲檢出，但先前研究指出大腸桿菌為自由營生阿米巴原蟲的營養，就一般常理而言，應是大腸桿菌群數越高越有利於自由營生阿米巴原蟲生長，但本研究相對是較低狀態易檢出棘阿米巴原蟲，但雖然是較低數量大腸桿菌數易檢出棘阿米巴原蟲，就數據中位數探討，大多數存在大腸桿菌數約 3000 左右是檢出率最多的範圍，故本研究結論認為棘阿米巴原蟲易存在於數量約 3000CFU/100ml 的大腸桿菌群數中，過高的狀態顯示環境中大腸桿菌數過多，表示水體污染狀態嚴

重，反而不利於棘阿米巴原蟲生長，不過整體而言，棘阿米巴原蟲與目前常見物理性水質參數多屬無關，可能與棘阿米巴原蟲相對易感受性較低有關，從台灣地區過往參考文獻易發現棘阿米巴原蟲與常見水質指標較無相關，本次結果與先前文獻相符。而奈格里阿米巴原蟲與較多水指標相關，包含大腸桿菌、溫度、濁度、總懸浮固體、pH、化學需氧量及氨氣有顯著相關，表示該些指標的變動會影響檢出率，其中以氨氣與總懸浮固體呈現最顯著相關($p < 0.001$)，此兩類水質指標同樣易受到短期氣候影響。且大多數物理性水質指標均與奈格里阿米巴原蟲檢出有顯著相關($p < 0.01$)，顯示奈格里阿米巴原蟲易受到水質變化而導致檢出率變化，與先前季節探討推論相似，奈格里阿米巴原蟲相對於棘阿米巴原蟲易受到水質變化影響，與先前研究相符，故本研究推論進行短期氣候變遷可利用奈格里阿米巴原蟲進行探討。

(2) 朴子河流域中自由營生阿米巴原蟲與其水質參數相關性分析

於朴子溪樣本中進行統計U檢定(表 10 及表 11)，結果顯示棘阿米巴原蟲僅與鹽度呈現顯著相關($p < 0.05$)而奈格里阿米巴原蟲與鹽度及溶氧飽和度呈現顯著相關($p \leq 0.01$)，表示該些指標的變動會影響檢出率，棘阿米巴原蟲存在於鹽度較高，因只有朴子河流域進行水體鹽度分析，故從此統計結果可支持先前地理分布時發現下游接近出海口鹽度較高還水仍有棘阿米巴原蟲存在，棘阿米巴原蟲可以耐受較高鹽度之水體，因此棘阿米巴原蟲相對是耐受性較高之自由營生阿米巴原蟲。而從表 11 發現，奈格里阿米巴原蟲與兩項水質參數相關，而與鹽度相關性為較低鹽度較易檢出奈格里阿米巴原蟲，故可解釋先前地理分布為何奈格里阿米巴原蟲多處於中上游位置，而溶氧飽和度與河川水庫水質檢定結果一致均呈現較低狀態較易檢出，顯示在不同水質溶氧飽和度同樣影響著奈格里阿米巴原蟲的存在情形，亦可推論奈格

里阿米巴原蟲易受到外在環境影響而使其存在情形改變。

(3) 溫泉中奈格里阿米巴原蟲與其水質參數相關性分析

於溫泉樣本中進行統計U檢定(表 12)，結果顯示奈格里阿米巴原蟲，不受到濁度、pH 及溶氧飽和度影響外，與其他水質指標皆有顯著相關，其中生物性指標，結果與河川水庫結果相異，但從範圍來看，因為溫泉水質中本來大腸桿菌就相對河川水庫水體明顯低許多，差距 10 倍以上，就如先前文獻指出大腸桿菌群為自由營生阿米巴原蟲重要營養源之一，故此結果於溫泉水體屬於合理，易與先前文獻相符。其中物理性指標以導電度最為顯著相關，而導電度與溫泉泉質有高度相關性，導電度較低水體較易檢出奈格里阿米巴原蟲，顯示導電度較低之溫泉泉質反而較易有奈格里阿米巴原蟲，這可深入探討奈格里阿米巴原蟲的生物特性，以利於後續探討如何預測或防治奈格里阿米巴原蟲之參考。

(4) 綜合水體樣本中自由營生阿米巴原蟲與其水質參數相關性分析

本研究將所有檢出兩類自由營生阿米巴原蟲水體之水質參數進行統整性分析，探討不同來源之自由營生阿米巴原蟲是否對某些水質同樣具有顯著相關性。進行統計U檢定(表 13、14)，結果顯示奈格里阿米巴原蟲對所有水質指標均顯著相關，反之棘阿米巴原蟲對水質指標均無顯著相關，顯示兩種自由營生阿米巴原蟲對於環境易感受性有非常大的差異，棘阿米巴原蟲不易受到水質變化導致其不易生存，換句話說意旨棘阿米巴原蟲環境耐受性較高，同樣的奈格里阿米巴原蟲對所有指標均有影響，顯示其對環境耐受性較差，故在某些特定條件水質中才生存，故未來可藉由大數據的水質指標數據來推估自由營生阿米巴原蟲於水環境中的存在情形。上述結果同樣給我們對於兩種原蟲對短期氣候因子影響的假說更大的支持度，本研究推測奈格里阿米

巴原蟲易受短期氣候因子影響，棘阿米巴原蟲不易受短期氣候因子影響，可能與長期氣候因子有關，但因本計畫僅執行第二年，故長期氣候因子影響須更長期數據累積方可探討。

(5) 致病型與非致病型棘阿米巴原蟲與其水質參數相關性分析

本研究將定序分型之棘阿米巴原蟲進行致病性與非致病性型別與水質參數間分析，統計U檢定結果如表 15 所示，因致病型棘阿米巴原蟲為多數有 38 株，非致病性僅 7 株，故樣本亦有偏差問題，結果顯示與水質指標皆無有顯著相關。因此，本研究期望收集更多數據進行分析，以瞭解致病型與非致病型於不同水質環境間是否有影響，以提供後續風險評估與研究之參考。

(6) 強降雨事件對原蟲檢出率影響探討

本年度進行兩次強降雨事件後採樣，但礙於安全性與經費問題，故本次每次降雨事件後僅進行兩個採樣點檢驗，分別為事件發生後第 1.3.8 及 12 天進行採樣，但此兩次結果與大雨事件後平均雨量遞減等並無任何線性相關，而探討基因型別上之變化，因數據量不足並無無法進行任何相關性檢定，故建議後續須於強降雨事件後進行大規模採樣點檢驗，較能獲得有效數據。

7. 氣候因子與水庫溪流水體中自由營生阿米巴原蟲之邏輯斯迴歸分析

(1) 氣候因子對水庫水體中自由營生阿米巴原蟲之邏輯斯迴歸分析

本研究將採檢日期之檢出率與氣候資料進行圖表分析，以利判斷與何種氣候因子有關，且是否屬於長期變化或短期變化，以利於後續進行邏輯斯迴歸檢定，圖表繪製示意圖如圖 21 所示，此外本研究採樣氣候資料來源為氣象局局屬測站之資料，測站與本研究採樣之水庫河川有些微距離差異，但本研究採最近測站為代表，雖有誤差存在，

但仍屬可分析狀態，主要參考過往臨床資料結合氣候因子探討之依據，如蘭潭水庫與仁義潭水庫雖有地點上之差異，但採樣之氣象局測站均為嘉義市東區測站，這些誤差需要後續利用距離等不同模式進行分析，本研究期望能有相關研究提供分析。本研究將水庫河川樣本分開進行氣候因子探討，原因為水庫屬於長期較為水體穩定狀態，而台灣地區溪流多屬水量變化急遽，故氣候因子對此兩類水體影響可能有所差異，故本研究分開探討後會合併探討，氣象資料為採樣點鄰近之氣象測站數據。

水庫樣本兩類自由營生阿米巴原蟲檢出時間點與氣候邏輯斯迴歸分析結果如表 16 及表 17 所示，使用 Hosmer-Lemeshow 檢定確定使用數據為常態分布，兩類致病菌之檢定 p-value 皆大於 0.05，適合使用邏輯斯迴歸模式進行分析，檢定表 15 之 OR 值顯示，相對濕度有利於奈格里阿米巴原蟲的生存(OR 值>1)表示檢出率與相對溼度成正相關，且三日平均相對濕度較當日相對濕度影響較大，相對溼度對於奈格里阿米巴原蟲的檢出具有顯著意義($P<0.01$)。而降雨量之影響其顯著意義更高($P<0.001$)，比較當日降雨量、三日平均降雨量及三日累積降雨量，三日累積降雨量(OR=1.214)影響比較大，故可以使用三日平均降雨量來探討奈格里阿米巴原蟲存在情形。而對日照時數與日照量數據探討，對於當日日照時數及日照量並無顯著相關性，但對於三日平均或累積之日照量及日照時數呈現負相關，而以三日平均日照量(OR=0.828)及日照時數(OR=0.705)影響較大，奈格里阿米巴原蟲存在情形與氣溫則較無顯著關係。但就奈格里阿米巴原蟲於水庫水體樣本亦受到氣候的影響，與先前假定推論奈格里阿米巴原蟲易受短期間氣候因子影響相符。

而表 16 所顯示的是棘阿米巴原蟲與同樣條件氣候下的邏輯斯迴

歸分析結果，顯示棘阿米巴原蟲不易受短期間氣候因子影響，因所有因子都不具顯著性，這與先前推論相符，顯示是棘阿米巴原蟲受長時間因子影響(例如:季節等)，較不易受短期間氣候因子所影響，相對較為穩定。

(2) 氣候因子對溪流水體中自由營生阿米巴原蟲之邏輯斯迴歸分析

溪流水體除受氣候因子影響，本身水量就具有較高變異度，所以短期間氣候影響可能變異過大，而從表 18 及表 19 發現，棘阿米巴原蟲同樣與短期間氣候因子較無顯著相關性，但奈格里阿米巴原蟲與氣溫則有顯著相關性，對於當日氣溫與三日平均氣溫呈現負相關，而已三日平均氣溫(OR=0.865)影響較大，故不論在溪流水體或水庫水體，奈格里阿米巴原蟲均較易受短期氣候因子影響，雖其他氣候因子未達顯著性，但顯著 p 值仍相對棘阿米巴原蟲較為顯著。但溪流水體中反而氣溫是主要影響奈格里阿米巴原蟲存在重要因子，與水庫環境是有所差異的。

(3) 氣候因子對河川及溪流綜合水體中自由營生阿米巴原蟲之邏輯斯迴歸分析

本研究綜合上述兩總水體進行邏輯斯迴歸分析，從表 20 依舊發現棘阿米巴原蟲同樣與短期間氣候因子較無顯著相關性，更加驗證先前推論棘阿米巴原蟲耐受性較高且不易受短期氣候因子影響有關，故須使用更大尺度之分析，才可了解氣候因子如何影響棘阿米巴原蟲，但仍需更多氣候資料與檢驗結果輔助，期望能持續進行此類水體監控。從表 21，顯示奈格里阿米巴原蟲與短期本研究選取之氣候因子均有顯著相關性，其中與 3 日平均日照量及 3 日平均相對濕度具有高度顯著相關，但亦與 3 日平均日照時數、3 日平均降雨量及 3 日平均氣溫顯著相關，而與平均濕度及平均降雨量呈現正相關，與平均氣

溫、平均日照時數及平均日照量呈現負相關，因此不論在何種水體環境奈格里阿米巴原蟲均亦受短期氣候因子影響，期望後續使用推估模型去預測奈格里阿米巴原蟲的存在情形與分析。

(4) 氣候因子對水體中奈格里阿米巴原蟲之多變量邏輯斯迴歸分析

水庫樣本兩類自由營生阿米巴原蟲檢出時間點與多變量氣候因子邏輯斯迴歸分析結果如表 22、表 23 及表 24 所示，以水庫水體中的奈格里阿米巴原蟲而言，3 天平均日照量(估計係數=-3.003, 機率值=0.076)是影響力最大之因子，其與奈格里阿米巴的檢出率為負相關影響，與先前單變量邏輯斯迴歸結果相似，顯示 3 天平均日照量對於水庫水體中奈格里阿米巴原蟲檢出率有較高度負相關性存在。以溪流水體中的奈格里阿米巴原蟲而言，當天日照時數(估計係數=-2.832, 機率值=0.079)是影響力最大之因子，其與奈格里阿米巴的檢出率為負相關影響，與先前單變量邏輯斯迴歸結果相似，顯示當天平均日照量對於溪流水體中奈格里阿米巴原蟲檢出率有較高度負相關性存在。因此不論在何種水體中的奈格里阿米巴與短期氣候因子最有相關均與日照量有關，這是值得後續探討之議題。但統整兩類水體進行多變量邏輯斯迴歸卻發現均無一因子達達到 10% 顯著水準(機率值<0.1)，但相對溼度為最接近 10% 顯著水準之氣候因子(機率值=0.117)，其估計係數為 0.424，呈現低度正相關。

四、結論與建議

第一年度

1. 本研究目前建立不同水體原蟲檢驗方法及採檢流程與方法的標準程序，將有利於後續進行環境自由營生阿米巴、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲及微孢子蟲之檢驗。
2. 已初步完成全年度不同水體之自由營生阿米巴、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲及微孢子蟲存在情形與季節相關性。顯示在溪流及水庫水體中自由營生阿米巴以棘阿米巴為主，溫泉水體則以奈格里阿米巴為主。自由營生阿米巴與季節的相關性，溫泉水體以春季檢出率較低，但溪流及水庫水體則以春季檢出率較高，顯示溫泉水體環境與溪流及水庫水體是兩種不同類型之水體生態。
3. 分析棘阿米巴型別與各種水體之相關性。顯示溫泉水體中棘阿米巴型別均較與人類致病性無關，多為環境蟲株。而溪流與水庫水體則多存在導致人類疾病之蟲株。因此，接觸此類水體需更加注意安全與衛生。
4. 梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲可當成外在環境污染指標，而本研發現台灣溫泉水體及水庫水體未檢出，隱孢子蟲有一處溪流有檢出，需持續監控並在做附近之環境調查，梨形鞭毛蟲則在朴子溪及另一條溪流中檢出，朴子溪流樣本點周遭為畜牧區域，因此可針對周遭畜牧廢水進行檢測，以尋找污染源頭。
5. 氣候與原蟲檢出率與型別變化之關係，初步認為與降雨有關，但仍需更多數據佐證，進行統計分析才可獲得更完善資訊。
6. 微孢子蟲檢驗方法仍需改進以有效檢研人體致病性蟲株，並建立適當的型別分析方式，以建立台灣水體環境微孢子蟲的分佈情形，以期釐清其來源。

第二年度

1. 本研究目前建立不同水體原蟲檢驗方法及採檢流程與方法的標準程序，將有利於後續進行環境自由營生阿米巴原蟲、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲及微孢子蟲之檢驗。
2. 已完成大部分全年度不同水體之自由營生阿米巴原蟲、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲及微孢子蟲存在情形。
3. 已建立新方式檢驗水體中角膜條微孢蟲，並已完成偵測極限測試與多數環境篩檢，顯示溫泉水體約有 20% 檢出率，而於溪流及水庫樣本則高達 90% 左右之檢出率。
4. 從親源演化分析探討台灣地區的角膜條微孢蟲可能除了存在感染眼疾之病原體蟲株外，亦存在可能會導致腹瀉之角膜條微孢蟲，此結果需後續臨床檢驗分析與環境分離實驗探討之。
5. 分析棘阿米巴原蟲型別與各種水體之相關性。顯示溫泉水體中本年度檢測與前一年度結果相異，本年度棘阿米巴原蟲型別多為 T4 基因型較與人類致病性相關，多為感染性蟲株。而溪流與水庫水體與前一年度相同，多存在導致人類疾病之蟲株。因此，接觸此類水體需更加注意安全與衛生。
6. 梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲可當成外在環境污染指標，而本研究針對朴子溪流域周遭畜牧廢水進行檢測，發現污染源頭兩處來自畜牧場外排放廢水而一處為農牧區集合排放水處，此兩類病原對腹瀉感染是具有高度風險，且型別為常見人體感染之型別，故須對於排放廢水進行嚴格監控，已防止疾病發生。
7. 氣候與自由營生阿米巴原蟲檢出率之相關性分析，本研究採用邏輯斯迴歸，發現棘阿米巴原蟲檢出時間點與短期間氣候因子均無顯著相關性，但奈格里阿米巴對於短期間氣候因子則呈現有顯

著相關，目前分析與三日平均氣溫、平均日照時數、平均降雨、平均日照量及平均相對濕度均有關，而以水庫水體中奈格里阿米巴與氣候因子相關性較為顯著。

8. 自由營生阿米巴與水質參數之間相關性分析，在不同水體間有不一樣相關性存在，但比較特別處為朴子溪流域分析顯示，兩種不同類型自由營生阿米巴原蟲與鹽度呈現相異相關性，棘阿米巴原蟲可耐受較高鹽度之水體，而奈格里阿米巴相對處於鹽度較小之水體。

9. 自由營生阿米巴原蟲於朴子溪中分布情形可了解型別在不同季節間改變狀況，且結果與水質指標鹽度相關相呼應。

五、重要研究成果及具體建議

第一年度

1. 已建立台灣地區全年度三種不同種類水體的四季病原性原蟲分布情形調查(成果)。
2. 已於朴子溪進行流域在不同季節，進行自由營生阿米巴型別與檢出變化，可增加周遭環境因子等資訊，可建立地理原蟲流佈與變遷分析，期望後續持續研究(成果與建議)。
3. 因水庫水源區及溪流均有檢出高致病風險之棘阿米巴型別，故於戲水遊憩時需注意安全與衛生，避免感染眼睛，若個人免疫力低下時更需注意避免傷口污染與滄水(建議)。
4. 增加水源中化學物質分析，如:磷或鈣等與生物挹注相關之化學物質，探討環境生物挹注化學物質變化與病原體變遷相關性(建議)。
5. 與氣象單位合作建立採樣點氣候變異與長期觀察，以大數據方式進行探討，建立更完善分析以利獲得最佳結果(建議)。
6. 朴子溪流上、中、下游三個區域在冬春兩季顯示棘阿米巴有區域性存在情形，而在夏季有共通型別存在，與氣候或地理環境上相關性是值得深入探討之議題(成果與建議)。

第二年度

1. 建立台灣地區本年度四種不同種類水體的前三季病原性原蟲分布情形調查(成果)。
2. 以自由營生阿米巴原蟲建立氣候因子與存在情形之邏輯斯迴歸分析模式(成果)。
3. 建立自由營生阿米巴原蟲與水質指標間相關性分析(成果)。
4. 以朴子溪及河川水庫樣本於不同季節，進行與長時間氣候相關

性分析 (成果)。

5. 本年度溫泉中檢出棘阿米巴原蟲，且型別為致病性 T4 基因型，需更加注意溫泉活動安全與監控(成果與建議)。
6. 因水庫水源區及溪流本年度亦均有檢出高致病風險之棘阿米巴原蟲型別，故於戲水遊憩時需注意安全與衛生，避免感染眼睛，若個人免疫力低下時更需注意避免傷口污染與嗆水(建議)。
7. 完成新角膜條微孢蟲檢驗方式並成功與過往危險因子連結，全台溫泉平均有 20% 檢出率，且存在角膜感染致病型與腹瀉感染型，故應注意溫泉活動之安全與監控，本研究成果目前以投稿至 water research 審稿中(成果與建議)。
8. 本年度進行較多水質參數與自由營生阿米巴原蟲相關分析，發現與化學需氧量或飽和溶氧度有顯著相關，故可深入探討環境生物挹注化學物質變化與病原體變遷相關性(成果與建議)。
7. 期望持續與氣象單位合作建立採樣點氣候變異與長期觀察，以大數據方式進行探討，建立更完善分析以利獲得最佳結果(建議)。
8. 梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲檢出顯示有高度疾病傳染風險，故本研究建議持續進行農牧產業排放廢水之監控(建議)。

六、参考文献

Amorn Lekkla, Chantira Sutthikornchai, Somchai Bovornkitti and Yaowalark Sukthana (2005) Free-living amoeba contamination in natural hot springs in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36 Suppl 4:5-9.

Alexeieff A (1912). Sur les caractères cytologiques et la systématique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov gen et *Hartmannia* nov. gen) et des amibes parasites des vertébrés (*Proctamoeba* nov. gen). Bull de la Soc Zool de France, 37, 55-74.

Al-Ahmad, A., Auschill, T.M., Braun, G., Hellwig, E. and Arweiler, N.B. (2006) Overestimation of *Streptococcus mutans* prevalence by nested PCR detection of the 16S rRNA gene. J Med Microbiol 55(Pt 1), 109-113.

Bharathi, M.J., Murugan, N., Kumar, G.R., Ramakrishnan, R., Anitha, V. and Ramesh, S. (2013) *Vittaforma corneae* keratitis in southern India: role of a novel duplex PCR. J Med Microbiol 62(Pt 4), 553-559.

Bryan, R.T., Cali, A., Owen, R.L. and Spencer, H.C. (1991) Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. Prog Clin Parasitol 2, 1-26.

Chan, K.S. and Koh, T.H. (2015) Microsporidian eye infection from outdoor recreational activities. J Clin Microbiol 53(2), 753.

Cain AR, Wiley PF, Brownell B, Warhurst DC (1981). Primary amoebic meningoencephalitis. Archives of Disease in Childhood, 56(2), 140-143.

Carter RF (1970). Description of a *Naegleria* spp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. J Pathol, 100, 217-244.

Chang SL (1978). Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. Appl Environ Microbiol, 35, 368-375.

Cogo PE, Scagli M, Gatti S, Rossetti F, Alaggio R, Laverda AM, Zhou L, Xiao L, Visvesvara GS (2004). Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. Emerg Infect Dis, 10, 1835-1837.

Craun, G.F., Nwachuku, N., Calderon, R.L., and Craun, M.F. (2002), Outbreaks in drinking-water systems, 1991-1998. Journal of Environmental Health, 65, 16-25.

Christen Rune Stensvold, Jessica Beser, Charlotte Axén, Marianne Lebbad (2014) High Applicability of a Novel Method for gp60-Based Subtyping of *Cryptosporidium meleagridis* Journal of Clinical Microbiology Volume 52 Number 7 p. 2311–2319

Corsaro, D., G. S. Pages, V. Catalan, J. F. Loret and G. Greub (2010). "Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213(3): 158-166.

Deplazes, P., Mathis, A., van Saanen, M., Iten, A., Keller, R., Tanner, I., Glauser, M.P., Weber, R. and Canning, E.U. (1998) Dual microsporidial infection due to *Vittaforma corneae* and *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 27(6), 1521-1524.

Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. and Modigliani, R. (1985) Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 32(2), 250-254.

Didier, E.S. (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94(1), 61-76.

Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K. and Didier, P.J. (2004) Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126(1-2), 145-166.

Dinoop, K.P., Parija, S.C., Mandal, J., Swaminathan, R.P. and Narayanan, P. (2016) Comparison of nested-multiplex, Taqman & SYBR Green real-time PCR in diagnosis of amoebic liver abscess in a tertiary health care institute in India. *Indian J Med Res* 143(1), 49-56.

Dowd, S.E., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. (1998a) Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64(9), 3332-3335.

Dowd, S.E., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. (1998b) Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9), 3332-3335.

Dhivya S, Madhavan HN, Rao ChM, Rao KS, Ramchander PV, Therese KL, Malathi J.(2007) Comparison of a novel semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a uniplex PCR for the detection of *Acanthamoeba* genome in corneal scrapings. *Parasitol Res.*100(6):1303-9.

Dennis E. Kyle and Gayle Pittman Noblet (1985) Vertical Distribution of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae in Freshwater Lakes. *The Journal of Protozoology* Volume 32, Issue 1, pages 99–105

Ettinger MR, Webb SR, Harris SA, McIninch SP, C Garman G, Brown

BL. (2003) Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res.* 2003 Jan;89(1):6-15.

Fan, N.W., et al., Microsporidial keratitis in patients with hot springs exposure. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(2): p. 414-8.

Feng Yaoyu * and Xiao Lihua (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of Giardia Species and Giardiasis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* Vol. 24, No. 1 p. 110–140

Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molina, J.M. and Derouin, F. (2000) Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 29(2), 95-100.

Gosiewski, T., Jurkiewicz-Badacz, D., Sroka, A., Brzychczy-Wloch, M. and Bulanda, M. (2014) A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood. *BMC Microbiol* 14, 144.

Guo, J.Q., Lin, H., Kantarjian, H., Talpaz, M., Champlin, R., Andreeff, M., Glassman, A. and Arlinghaus, R.B. (2002) Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 16(12), 2447-2453.

GAST, R. J., D. R. LEDEE, P. A. FUERST and T. J. BYERS (1996). "Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18s rDNA Sequence Types" *Department of Molecular Genetics*: 498-504.

Greub G., La Scola B. and Raoult D. (2003), "Parachlamydia acanthamoeba Is endosymbiotic or Lytic for *Acanthamoeba polyphaga* Depending on the Incubation Temperature" *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990:628-634.

Gubler, D. J. (2001) Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environmental Health Perspectives.*, 109:223-33.

Ghosh Kaya and Weiss Louis M.(2009) Molecular Diagnostic Tests for Microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* Volume 2009, Article ID 926521, 13 pages

Hsu, B.M., Lin, C.L. and Shih, F.C. (2009) Survey of pathogenic free-living amoebae and Legionella spp. in mud spring recreation area. *Water Research* 43(11), 2817-2828.

Hu, Y., Feng, Y.Y., Huang, C.C. and Xiao, L.H. (2014) Occurrence, Source, and Human Infection Potential of Cryptosporidium and Enterocytozoon bienersi in Drinking Source Water in Shanghai, China, during a Pig Carcass Disposal Incident. *Environmental Science &*

Technology 48(24), 14219-14227.

Huang, W.C., Chou, Y.P., Kao, P.M., Hsu, T.K., Su, H.C., Ho, Y.N., Yang, Y.C. and Hsu, B.M. (2016) Nested-PCR and TaqMan real-time quantitative PCR assays for human adenoviruses in environmental waters. *Water Sci Technol* 73(8), 1832-1841.

Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC. (2014) *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

John DT (1982). Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann Rev Microbiol*, 36, 101-123.

Ji, W.T., Hsu, B.M., Chang, T.Y., Hsu, T.K., Kao, P.M., Huang, K.H., Tsai, S.F., Huang, Y.L. and Fan, C.W. (2014) Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments. *Science of the Total Environment* 499, 212-219.

Joseph, J., Sridhar, M.S., Murthy, S. and Sharma, S. (2006) Clinical and microbiological profile of microsporidial keratoconjunctivitis in southern India. *Ophthalmology* 113(4), 531-537.

Kao, P.M., Hsu, B.M., Hsu, T.K., Liu, J.H., Chang, H.Y., Ji, W.T., Tzeng, K.J., Huang, S.W. and Huang, Y.L. (2015) Seasonal distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* species from drinking water reservoirs in Taiwan. *Environmental Science and Pollution Research* 22(5), 3766-3773.

Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Tsai, H.L., She, C.Y., Shen, S.M. and Huang, W.C. (2013) Real-time PCR method for the detection and quantification of *Acanthamoeba* species in various types of water samples. *Parasitology Research* 112(3), 1131-1136.

Koudela, B., Kucerova, S. and Hudcovic, T. (1999) Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol (Praha)* 46(3), 171-174.

Kwok, A.K.H., Tong, J.M.K., Tang, B.S.F., Poon, R.W.S., Li, W.W.T. and Yuen, K.Y. (2013) Outbreak of microsporidial keratoconjunctivitis with rugby sport due to soil exposure. *Eye* 27(6), 747-754.

Khan NA (2008). *Acanthamoeba* and the blood–brain barrier: the breakthrough. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 1051–1057.

Kathryn M. Miller and Charles R. Sterling (2007) Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of *Giardia lamblia* Cysts. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 5949–5950.

Lam, T.S., Wong, M.H. and Chuang, S.K. (2013) Microsporidial

Keratoconjunctivitis Outbreak among Athletes from Hong Kong Who Visited Singapore, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 19(3), 516-517.

Li, X. and Fayer, R. (2006) Infectivity of microsporidian spores exposed to temperature extremes and chemical disinfectants. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1, S77-79.

Loh, R.S., Chan, C.M., Ti, S.E., Lim, L., Chan, K.S. and Tan, D.T. (2009) Emerging prevalence of microsporidial keratitis in Singapore: epidemiology, clinical features, and management. *Ophthalmology* 116(12), 2348-2353.

Leiva B, Clasdorfer E, Linder E, et al. Free-living *Acanthamoeba* and *Negleria* spp. Amebae in water sources of León, Nicaragua. *Int J Trop Biol* 2007; 56(2): 439-46

Lauren J. Stockman, Carolyn J. Wright, Govinda S. Visvesvara, Barry S. Fields, Michael J. Beach (2011) Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA—1990–1992. Volume 108, Issue 3, pp 621-627

Ma, J.B., Li, P., Zhao, X.P., Xu, H.L., Wu, W.X., Wang, Y.F., Guo, Y.Q., Wang, L., Feng, Y.Y. and Xiao, L.H. (2015) Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienersi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Veterinary Parasitology* 207(3-4), 220-227.

Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis*, 12, 490-513.

Marciano-Cabral F (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev*, 52, 114-133.

Marciano-Cabral F, MacLean R, Mensah A, LaPat-Polasko L (2003). Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology* ,69(10), 5864-5869.

Martinez AJ, Visvesvara GS (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 7:583 – 598.

MICHEL PÉLANDAKIS*, STÉPHANIE SERRE and PIERRE PERNIN (2005) Analysis of the 5.8S rRNA Gene and the Internal Transcribed Spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri* *Journal of Eukaryotic Microbiology* Volume 47, Issue 2, pages 116–121,

Natalie Prystajek et al. (2014) Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a Microbial Source Tracking Tool for Surface Water: Application in a Mixed-Use Watershed. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p.2328-2336. (3800 cysts/100L

for *Giardia* spp

Natalie Prystajek et al. (2014) Assessment of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. as a Microbial Source Tracking Tool for Surface Water: Application in a Mixed-Use Watershed. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p.2328-2336.

Neff, R. J. (1958) ."Mechanisms of purifying amoebae by migration on agar surfaces". *J. Protozool.* 5, 226-231.

Patz, J. A., et al. (2000) The effects of changing weather on public health. *Annual Review of Public Health.*, 21:271-307.

Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, Da Silva AJ.(2006) Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3589–3595. doi: 10.1128/JCM.00875-06

Rivera F., Lares F., Gallegos E., Ramirez E., Bonilla P., Calderon A., Martinez J. J., Rodriguez S. and Alcocer J. (1989), "Pathogenic Amoebae in Natural Thermal Waters of Three Resorts of Hidalgo, Mexico" *Environmental Research*, 50:289-295.

Rivera F., Ramirez E., Bonilla P., Calderon A., Gallegos E., Rodriguez S., Ortiz R., Zaldivar B., Ramirez P. and Duran A. (1993), Pathogenic and Free-living Amoebae Isolated from Swimming Pools and Physiotherapy Tubs in Mexico. *Environmental Research*, 62, 43-52.

Rodriguez-Zaragoza S. (1994), "Ecology of free-living amoebae" *Critical Reviews in Microbiology*, 20, 225-241.

Rose, J. B., et al. (2001) Climate variability and change in the United States: potential impacts on water and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environmental Health Perspectives.*, 109 (Suppl 2):211-21.

Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivares, C.P. and Peyron, F. (1998) Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J Clin Microbiol* 36(1), 37-40.

Reddy, A.K., Balne, P.K., Garg, P. and Krishnaiah, S. (2011) Is microsporidial keratitis a seasonal infection in India? *Clinical Microbiology and Infection* 17(7), 1114-1116.

Shadduck, J.A., Meccoli, R.A., Davis, R. and Font, R.L. (1990) Isolation of a microsporidian from a human patient. *J Infect Dis* 162(3), 773-776.

Sharma, S., Das, S., Joseph, J., Vemuganti, G.K. and Murthy, S. (2011) Microsporidial keratitis: need for increased awareness. *Surv Ophthalmol*

56(1), 1-22.

Silveira, H., Canning, E.U. and Shadduck, J.A. (1993) Experimental infection of athymic mice with the human microsporidian *Nosema corneum*. *Parasitology* 107 (Pt 5), 489-496.

Sparfel, J.M., Sarfati, C., Liguory, O., Caroff, B., Dumoutier, N., Gueglio, B., Billaud, E., Raffi, F., Molina, J.M., Miegville, M. and Derouin, F. (1997) Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bieneusi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44(6), 78s-78s.

Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F. and Solter, L. (2016) Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol* 32(4), 336-348.

Sulaiman, I.M., Matos, O., Lobo, M.L. and Xiao, L. (2003) Identification of a new microsporidian parasite related to *Vittaforma corneae* in HIV-positive and HIV-negative patients from Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl, 586-590.

Schuster FL (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*, 15, 342-354.

Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM (2003), PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5914-5918.

Sheng, W.H., et al., First case of granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. 81(2): p. 277-9.

Su MY, Lee MS, Shyu LY, Lin WC, Hsiao PC, Wang CP, **Ji DD**, Chen KM, Lai SC. A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan. *Korean J Parasitol*. 2013. 51(2):203-6.

Sheehan KB*, Fagg JA, Ferris MJ and Henson JM (2003) PCR Detection and Analysis of the Free-Living Amoeba *Naegleria* in Hot Springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Oct; 69(10): 5914–5918.

Siddiqui Ruqaiyyah and Khan Naveed Ahmed (2012) Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors* doi:10.1186/1756-3305-5-6

Tung, M.C., et al., Identification and significance of *Naegleria fowleri* isolated from the hot spring which related to the first primary amebic

meningoencephalitis (PAM) patient in Taiwan. *Int J Parasitol*, 2013. 43(9): p. 691-6.

Tan, J., Lee, P., Lai, Y., Hishamuddin, P., Tay, J., Tan, A.L., Chan, K.S., Lin, R., Tan, D., Cutter, J. and Goh, K.T. (2013) Microsporidial keratoconjunctivitis after rugby tournament, Singapore. *Emerg Infect Dis* 19(9), 1484-1486.

USEPA (1998) Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 822-R-02-038, Office of Water, Washington, DC, USA.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50, 1-26.

Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H (2008). Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol*, 46:338 – 340.

Water Treatment Solutions Lenntech (2009),
<http://www.lenntech.com/library/diseases/diseases/waterborne-diseases.htm>

WHO (2003) Disease Outbreak News. World Health Organization Communicable Disease Surveillance and Response (CSR).

Weber, R., Deplazes, P. and Schwartz, D. (2000) Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 6, 166-192.

于台珊 (2005)，水中原蟲存在對退伍軍人菌殺菌效能之影響 行政院勞工委員會勞工衛生安全研究所。

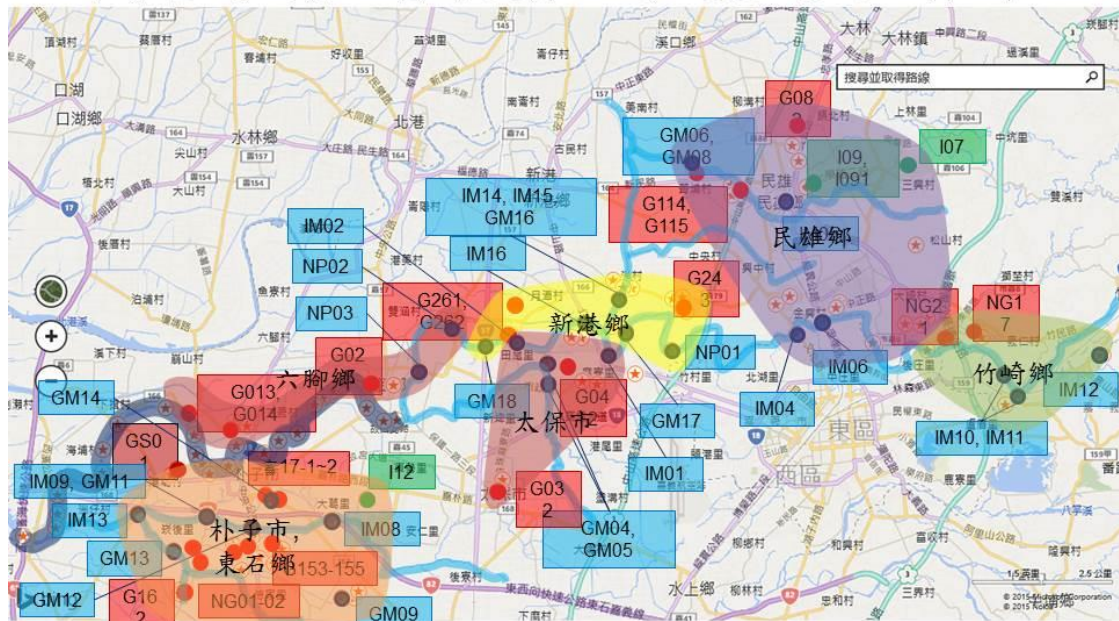
蘇慧貞 (2009)，氣候暖化對台灣防疫之風險與因應對策相關研究 行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫。

七、圖表



圖 1A、朴子溪流採樣點分布圖，合計 24 個固定採樣點，採樣點詳細資訊如表 1。

列管事業&畜牧業&河道監控點分布



紅色編號：為畜牧業清單本研究設定之編號。綠色編號：為列管事業清單本研究設定之編號。藍色編號：為本研究河道監控設定之編號。
 G：畜牧業 NG：新畜牧業 I：列管事業 GM：畜牧下游河道 IM：列管事業下游河道 NP：新朴子溪牛稠溪流河道採樣點
 深藍線：朴子溪採樣流域 淺藍線：朴子溪上游&牛稠河流域&荷色嶼大排分支

圖 1B、朴子溪相關民生畜牧廢水，合計 29 個固定採樣點。

表 1、朴子溪流採樣點經緯度與地標資訊表

編號	地標	經緯表示
1	吊橋	23.482350, 120.295233
3	人工溼地出水口	23.481883, 120.290867
5	蒜頭橋	23.486033, 120.284800
7	藍抽水站	23.491533, 120.273367
8	小竹林旁	23.489350, 120.269550
9	繩子	23.487250, 120.266933
10	沉精露頭	23.478117, 120.260717
12	德興社區	23.475767, 120.254483
14	朴仔腳	23.471817, 120.249317
16	朴子下游(電塔)	23.474083, 120.239583
18	朴子醫院	23.467800, 120.236800
20	碼頭上游	23.468383, 120.227700
21	碼頭	23.471333, 120.225617
22	電塔	23.477683, 120.224867
23	灌溉渠道水門	23.486033, 120.215017
25	港口大橋	23.480983, 120.198333
26	海浦	23.472883, 120.193383
27	圍潭 1	23.465533, 120.193067
28	圍潭 2	23.462633, 120.191050
29	鰻苗區	23.462467, 120.179317
30	東石大橋	23.458433, 120.177433
31	荷包嶼	23.452444, 120.177583
32	水門	23.447900, 120.176933
34	西濱快速道路	23.445306, 120.165667

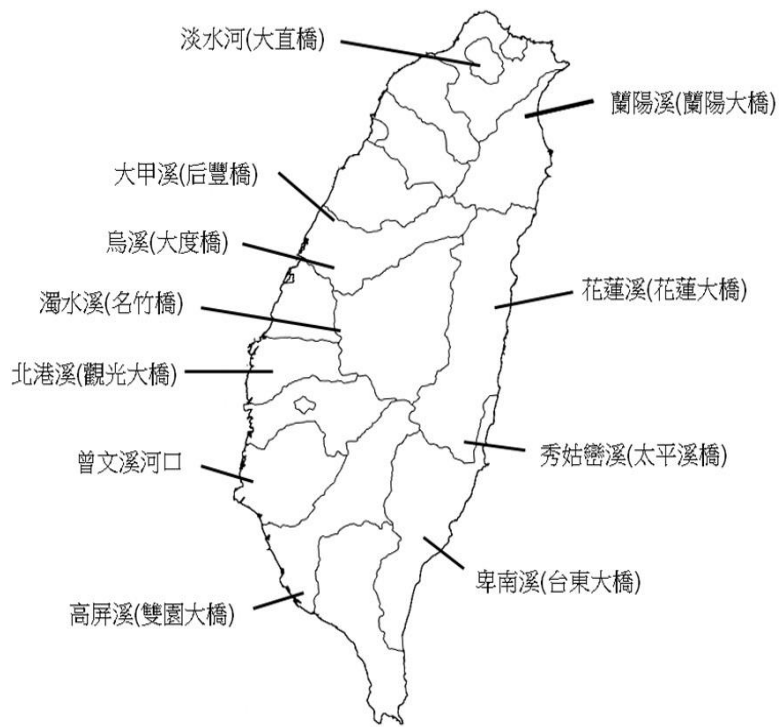


圖 2A、全台溪流採樣地點分布

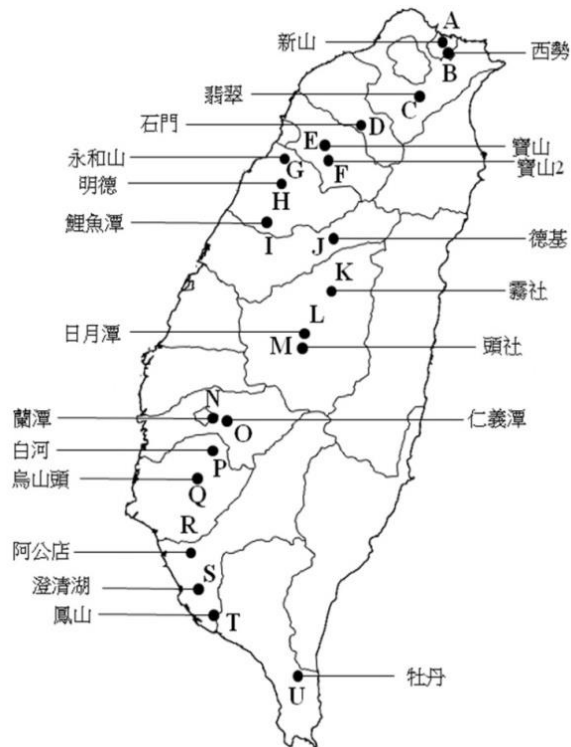


圖 2B、全台水庫採樣地點分布



圖 3. 日月潭採樣點分布圖

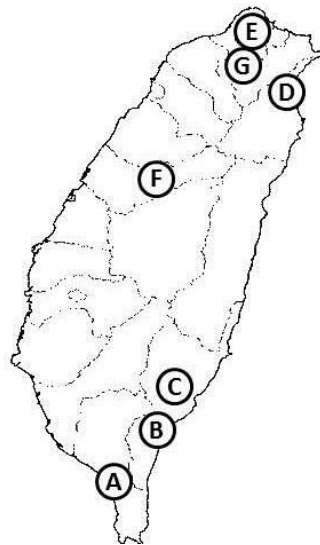


圖 4、全台溫泉採樣地點分布，A, B, C, D, E, F 及 G 的採樣點經緯度資料分別為四重溪溫泉 (22.095827, 120.749052)，金崙溫泉(22.532250, 120.954841)，知本溫泉 (22.693184, 121.015859)，礁溪溫泉(24.828800, 121.773526)，北投溫泉(25.141442, 121.510016)，谷關溫泉(24.203569, 121.007970) 及烏來溫泉(24.862428, 121.550968)

表 2、去除水中 PCR 抑制物實驗室條件實驗結果表

	水庫水體(蘭潭)	溪流水體(朴子溪)	溫泉水體(北投)
使用 Wizard DNA Clean-Up system 去除水中抑制物	71±2.7% (水庫水體/正控制組)	78±2.1% (溪流水體/正控制組)	82±3.7% (溫泉水體/正控制組)
未使用 Wizard DNA Clean-Up system 去除水中抑制物	54±5.7% (水庫水體/正控制組)	62±9.1% (溪流水體/正控制組)	71±4.7% (溫泉水體/正控制組)

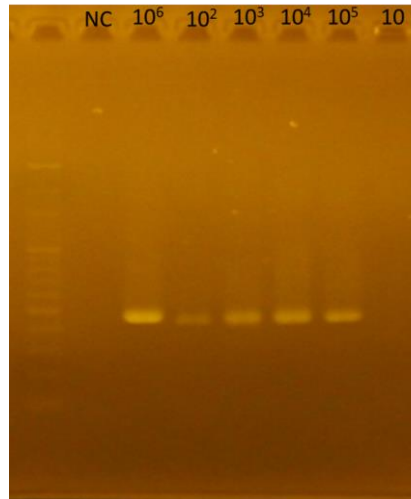


圖 5、水體原蟲回收評估之 PCR 電泳圖

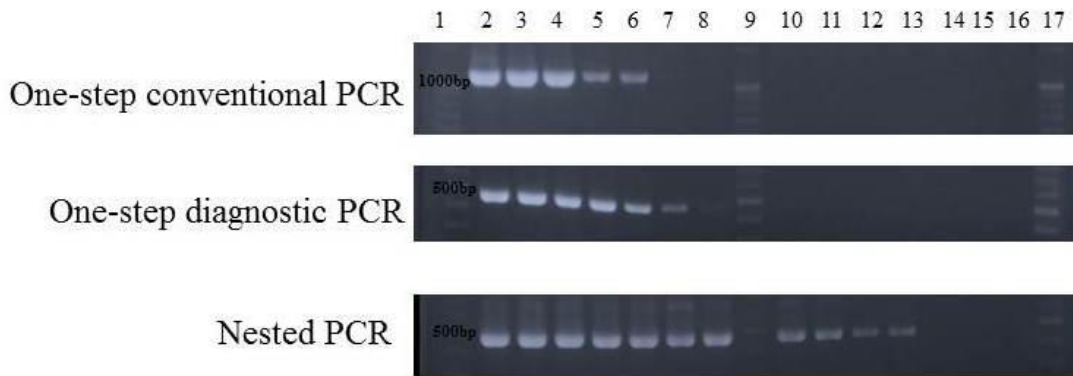


圖 6、三種不同 PCR 方式檢驗角膜微孢蟲之偵測極限比較圖 The PCR product of 1193-bp band was shown in one-step conventional PCR, while 472-bp band was appeared in one-step diagnostic PCR and nested PCR. Numbers on top of this figure presented the loading samples. Lane 1, 9 and 17 are marker (100 bp). The concentrations of *V. corneae* plasmid DNA in lane 2 to 8 are 5×10^{10} to 5×10^4 (copies/ μ l) with a series dilution in factor of 10, while the concentrations in lane 10 to 15 are 5×10^3 to 5×10^{-2} (copies/ μ l) with a series dilution in factor of 10. The lane 16 is a negative control sample.

表 3、本年度冬春夏前三季各類水體原蟲檢出率表

季數	第一季					第二季				第三季			
	冬					春				夏			
水樣	北部溫泉	全台溫泉	河川水庫	朴子溪	豬廢水	北部溫泉	河川水庫	朴子溪	豬廢水	北部溫泉	河川水庫	朴子溪	豬廢水
樣本數	n=16	n=60	n=31	n=24	n=29	n=21	n=31	n=24	n=29	n=20	n=31	n=24	n=29
檢測物種	檢出率												
Microsporidium	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	待檢測	0.00%	0.00%	0.00%	待檢測	0.00%	0.00%	0.00%	待檢測
Vittaforma corneae	25.00%	20.00%	96.67%	100.00%	100.00%	23.81%	90.32%	70.83%	待檢測	待檢測	84.38%	100.00%	100.00%
Cryptosporidium	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.45%	0.00%	0.00%	0.00%	3.45%
Giardia	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.45%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Acanthamoeba	0.00%	1.60%	36.70%	41.70%	未檢測	4.80%	22.60%	33.30%	未檢測	5.00%	21.88%	33.30%	未檢測
Naegleria spp.	12.50%	8.10%	40.00%	45.80%	未檢測	19.00%	61.90%	20.80%	未檢測	待檢測	40.60%	待檢測	未檢測

表 4、冬季溫泉角膜條微孢蟲檢出率表

採樣區域	採樣數量	<i>V. corneae</i> positive No.	檢出率
A	10	2	20%
B	8	3	37.5%
C	11	4	36.4%
D	9	2	22.2%
E	7	2	28.6%
F	15	2	13.3%
Total	60	15	20%

表 5、冬季溫泉角膜條微孢蟲於不同採樣設施之檢出率表

Facility type	Sample size	<i>V. corneae</i> positive No.	Detection rate
Public pool	28	6	21.4%
Personal pool	11	1	9.1%
Source	9	2	22.2%
Cold spring water tub	6	3	50%
Foot bath public pool	6	3	50%
Total	60	15	20%

表 6、冬季溫泉水體之水質指標與角膜條微孢蟲檢出率相關性分析表

Water quality parameters	<i>V. corneae</i> -positivity samples (n=15) Mean (Range)	<i>V. corneae</i> -negativity samples (n=45) Mean (Range)	P level of Mann-Whitney U test
HPC (CFU/mL)	57228.50 (1200-272000)	4429.21 (0-148000)	0.0410*
Total coliforms (CFU/100 mL)	208 (0-1248)	112.58 (0-1086)	0.327
Turbidity (NTU)	2.15 (0.49-12.6)	8.74 (0.1-152)	0.1679
Temperature (°C)	44.31 (26-80)	43.92 (22-92)	0.9407
pH	8.43 (3.3-9.47)	9.30 (2.26-9.99)	0.1602
Salinity (PSU)	0.68 (0.39-1.34)	1.21 (0.05-11.77)	0.2065

*P<0.05

表 7、角膜條微孢蟲檢出率與樣本於室內或室外/土壤暴露之相關性分析表

Pearson's Chi-squared test	<i>V. corneae</i> 陽性	<i>V. corneae</i> 陰性	總樣本數	P-value
	樣本數	樣本數		
室外環境/土壤暴露	14	15	29	0.0003008
室內環境	1	30	31	
總數	15	45	60	

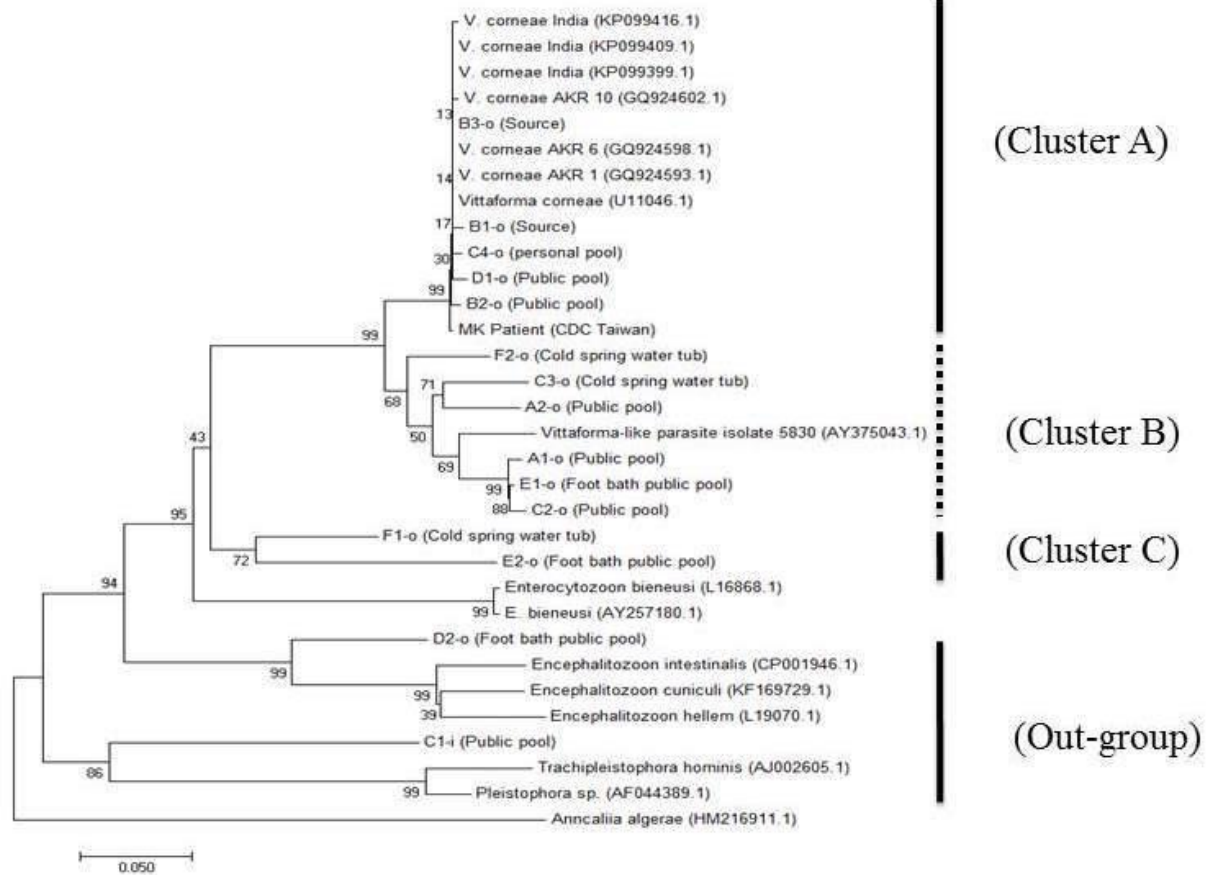


圖 7、角膜條微孢蟲序列親源演化分析圖 Bootstrap values (%) in 1000 pseudoreplicates for major lineage are indicated at the branch nodes. Cluster A included 5 hot spring samples, a positive control sample from Microsporidial keratitis (MK) patient, and 7 reference strains from MK patients in NCBI database. Cluster B included 6 aquatic samples of hot spring and a reference sample of *Vittaforma*-like parasite from NCBI database. Cluster C consisted of 2 aquatic samples of hot spring and two hot spring samples on out-group. The phylogenetic tree also included other pathogenic Microsporidia spp. from NCBI database. The facility type and gene number of NCBI were attached after each hot spring sample and reference strains. The symbol of (-o) and (-i) stand for outdoor and indoor, which indicated the location of sampling spots.



圖 8、外集群之樣本與其他微孢蟲序列分析圖 (A) C1-i (hot spring sample), *V. corneae*, *Pleistophora* and *Trachipleistophora hominis*; and (B) D2-o (hot spring sample), *V. corneae*, *E. bienewisi*, *Enterocytozoon intestinalis* and *Enterocytozoon cuniculi*. The highlights in yellow are the primer set sequences of *V. corneae* for nested PCR.

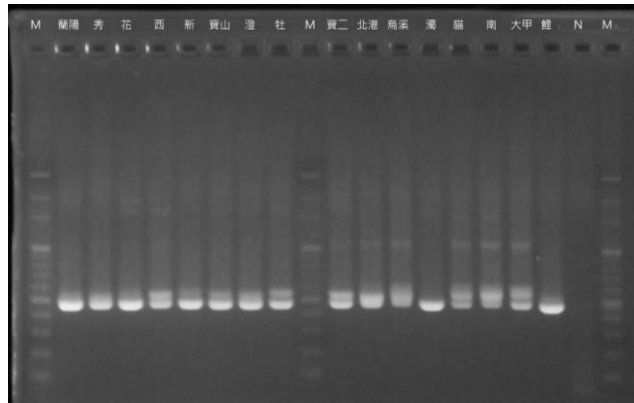


圖 9、河川水庫樣本角膜條微孢蟲 PCR 產物電泳圖

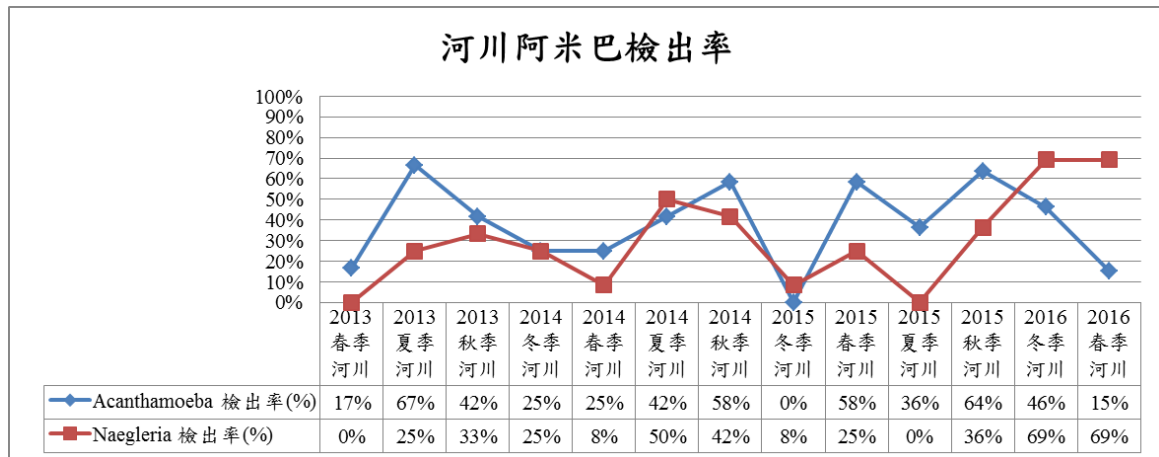


圖 10、河川樣本兩種自由營生阿米巴原蟲檢出率之季節折線圖(含台灣過往研究數據:

來源為中正大學許曷慕老師實驗室)

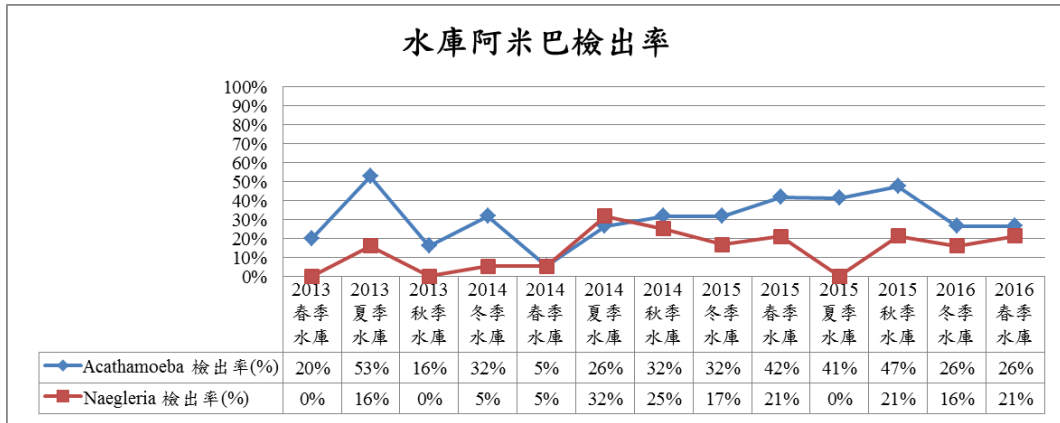


圖 11、水庫樣本兩種自由營生阿米巴原蟲檢出率之季節折線圖(含台灣過往研究數據：
來源為中正大學許曷慕老師實驗室)

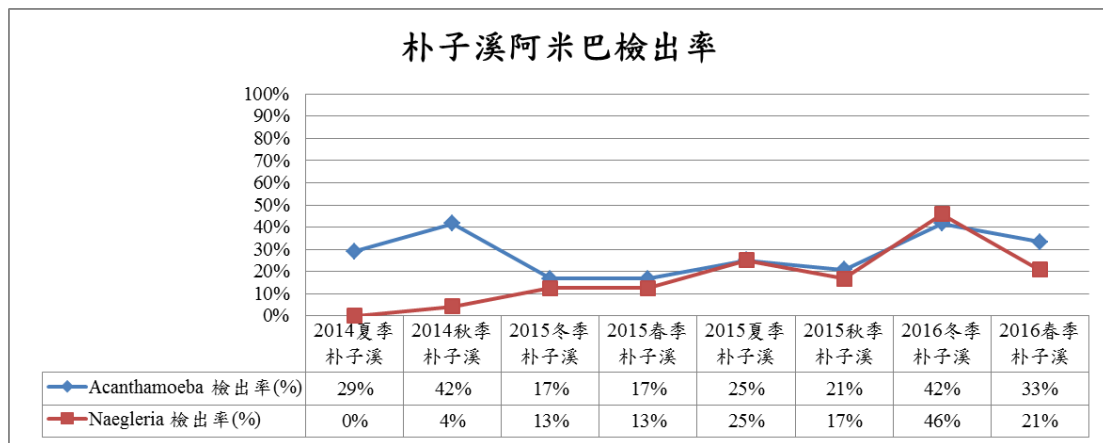


圖 12、朴子溪流域固定 24 個採樣點兩種自由營生阿米巴原蟲檢出率之季節折線圖

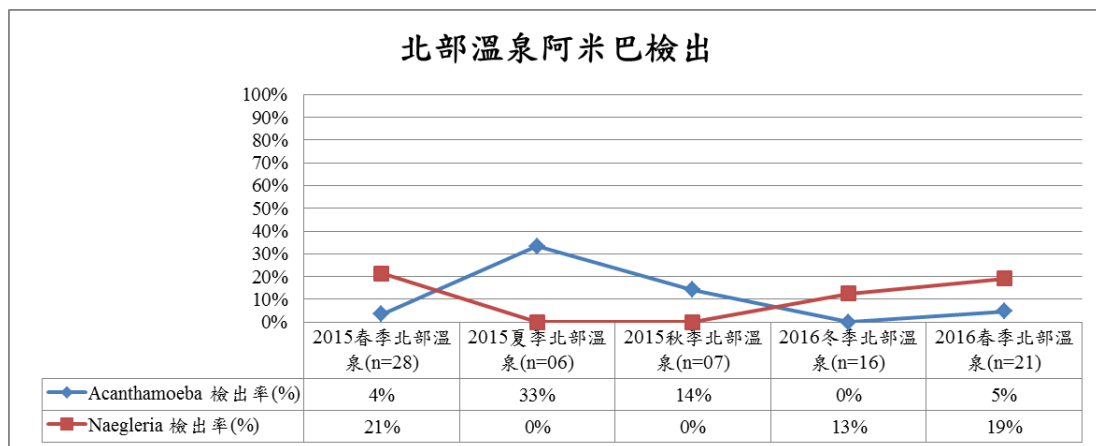


圖 13、北部溫泉區兩種自由營生阿米巴原蟲檢出率之季節折線圖

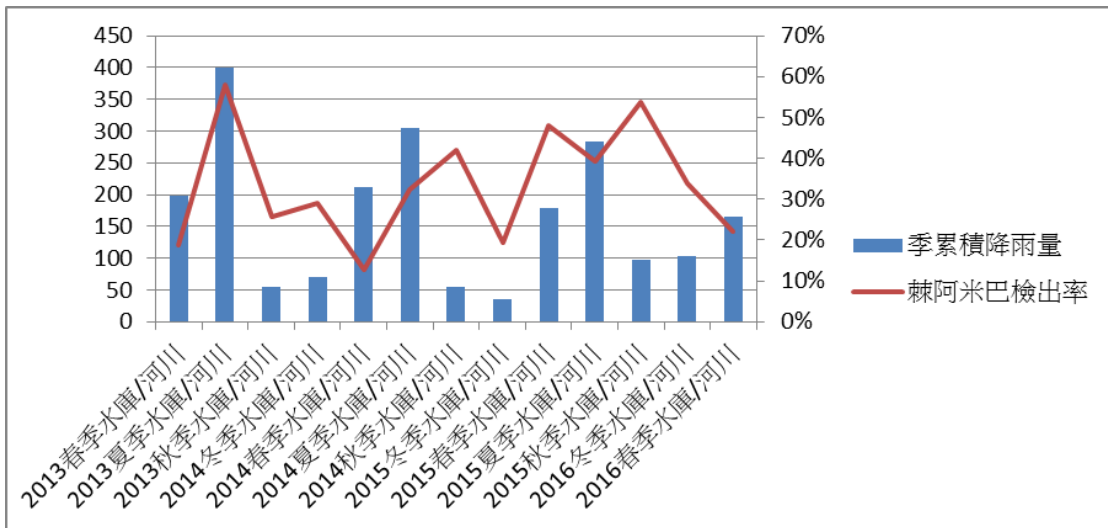
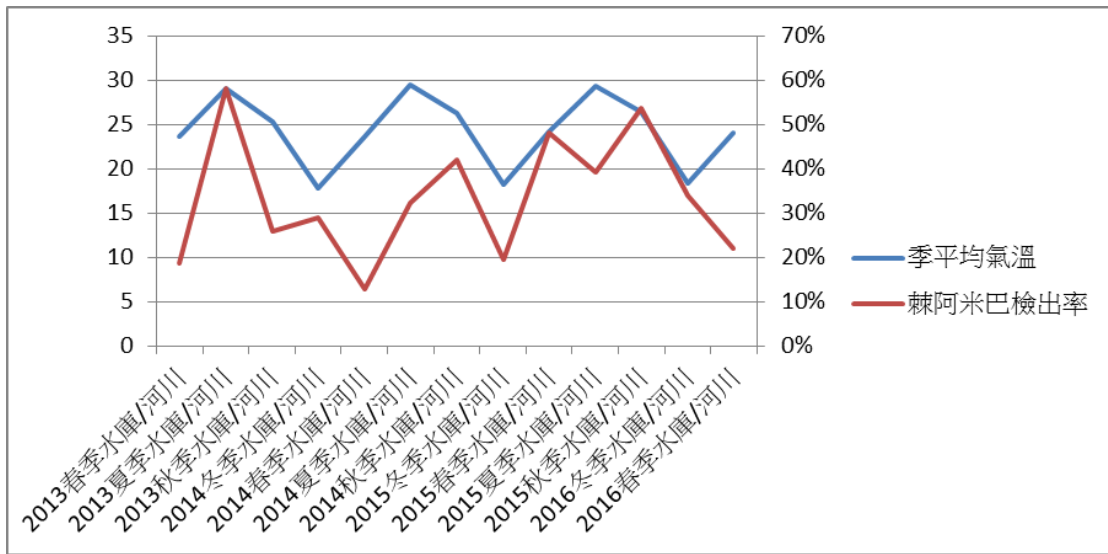


圖 14、水庫/河川樣本中棘阿米巴原蟲檢出率與全台氣候季平均及季累積降雨量統計分析圖

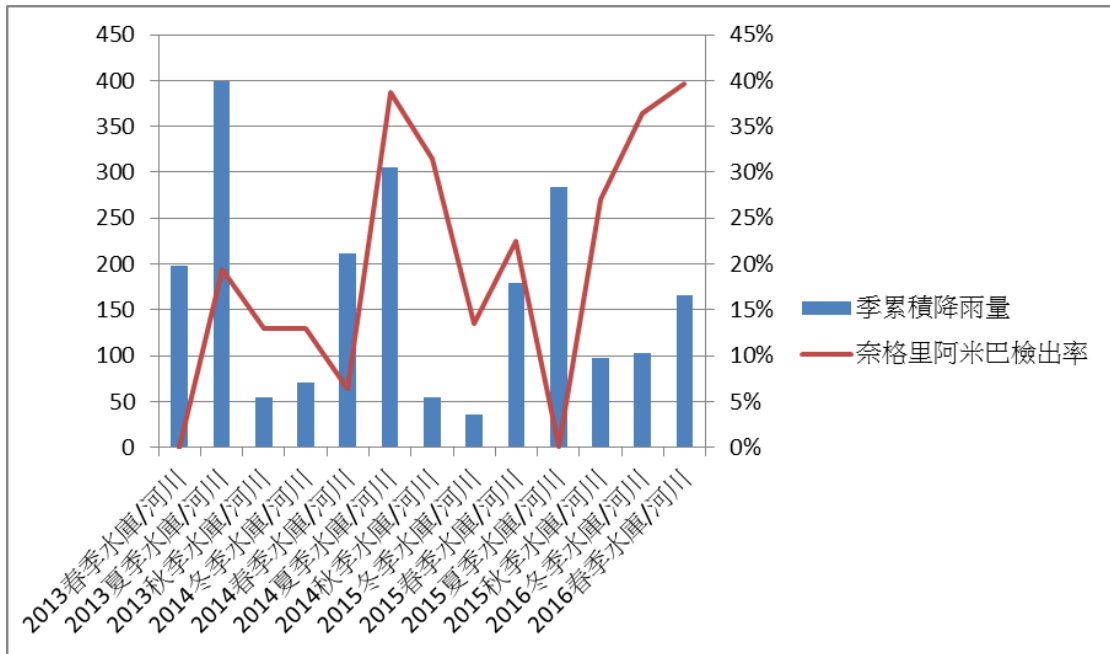
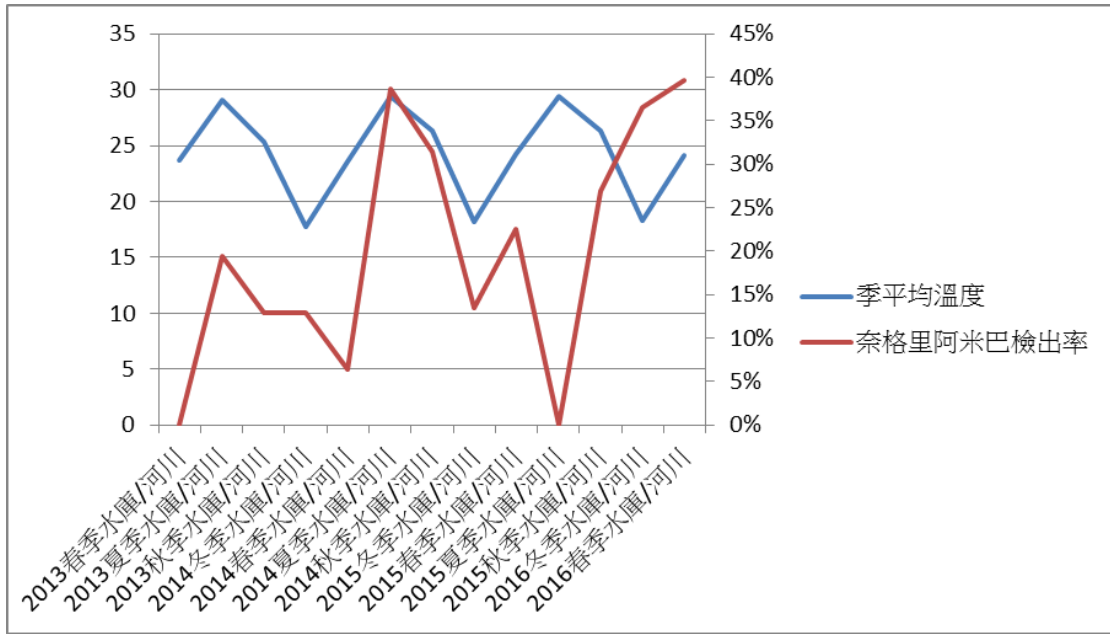


圖 15、水庫/河川樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與全台氣候季平均及季累積降雨量統計分析圖

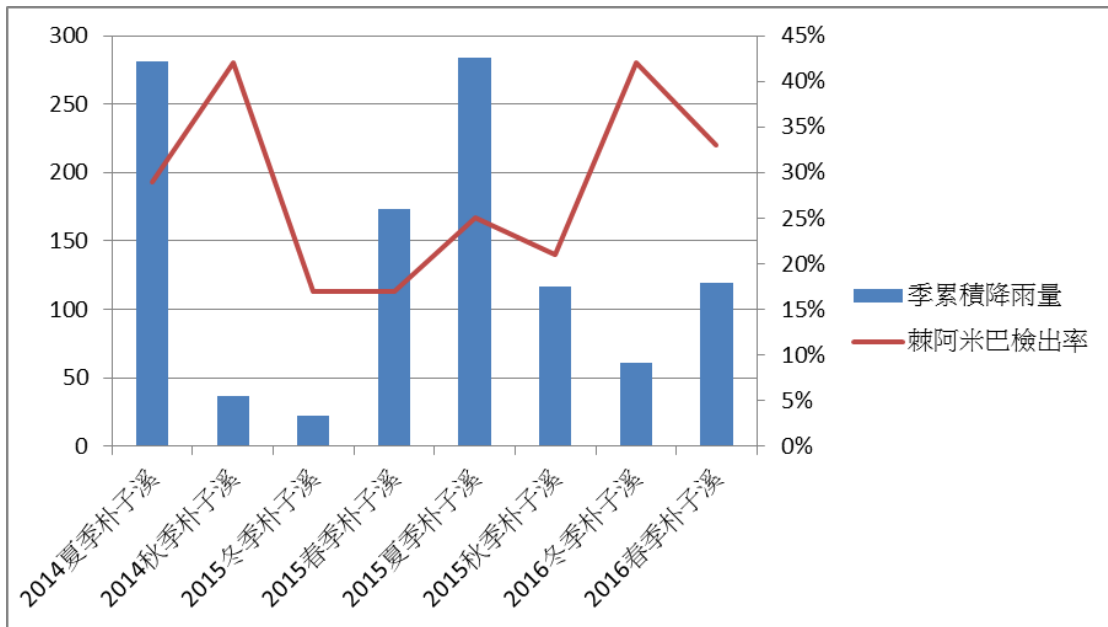
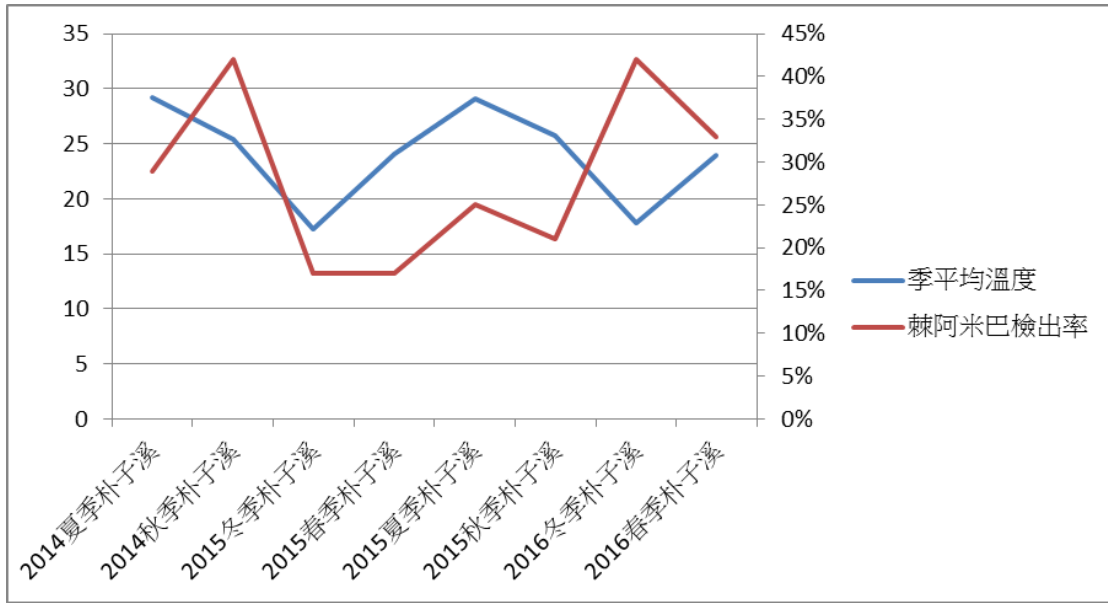


圖 16、朴子溪樣本中棘阿米巴原蟲檢出率與全台氣候季平均及季累積降雨量統計分析圖

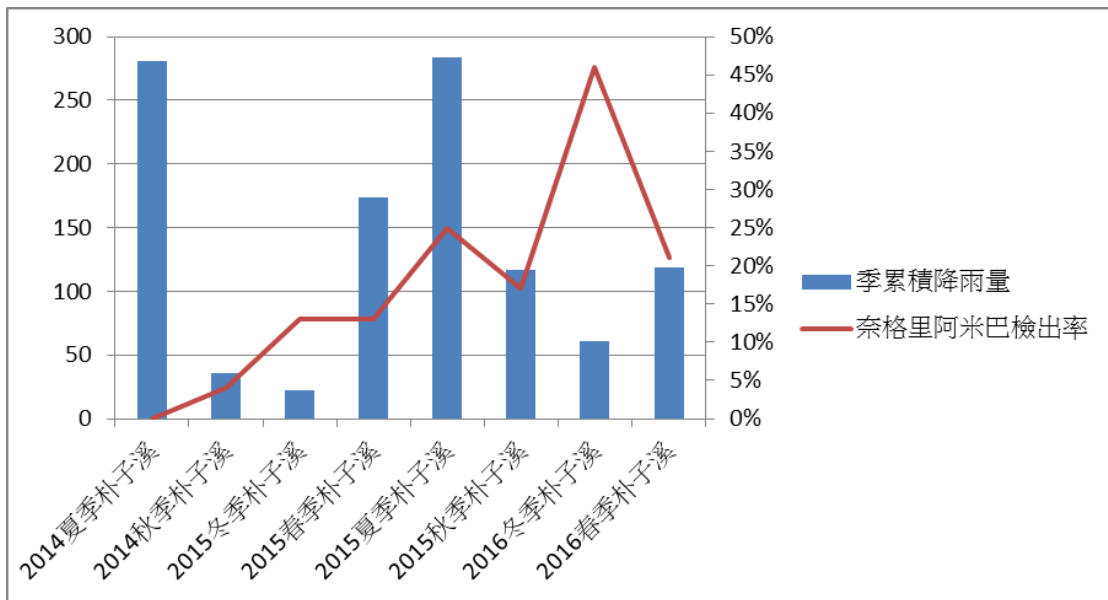
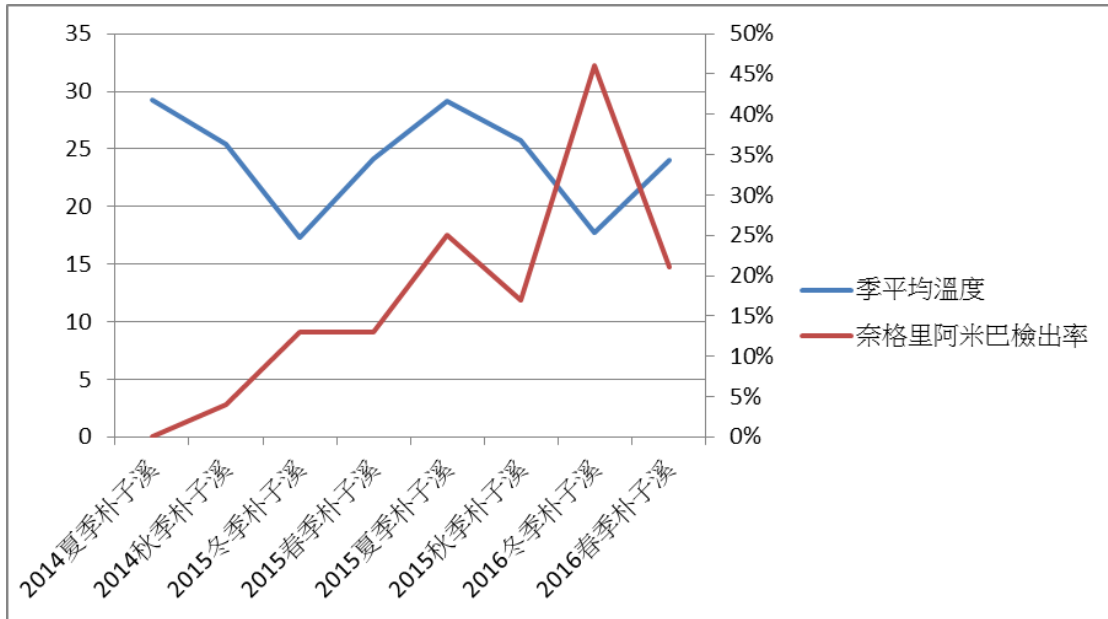


圖 17、朴子溪樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與全台氣候季平均及季累積降雨量統計分析圖

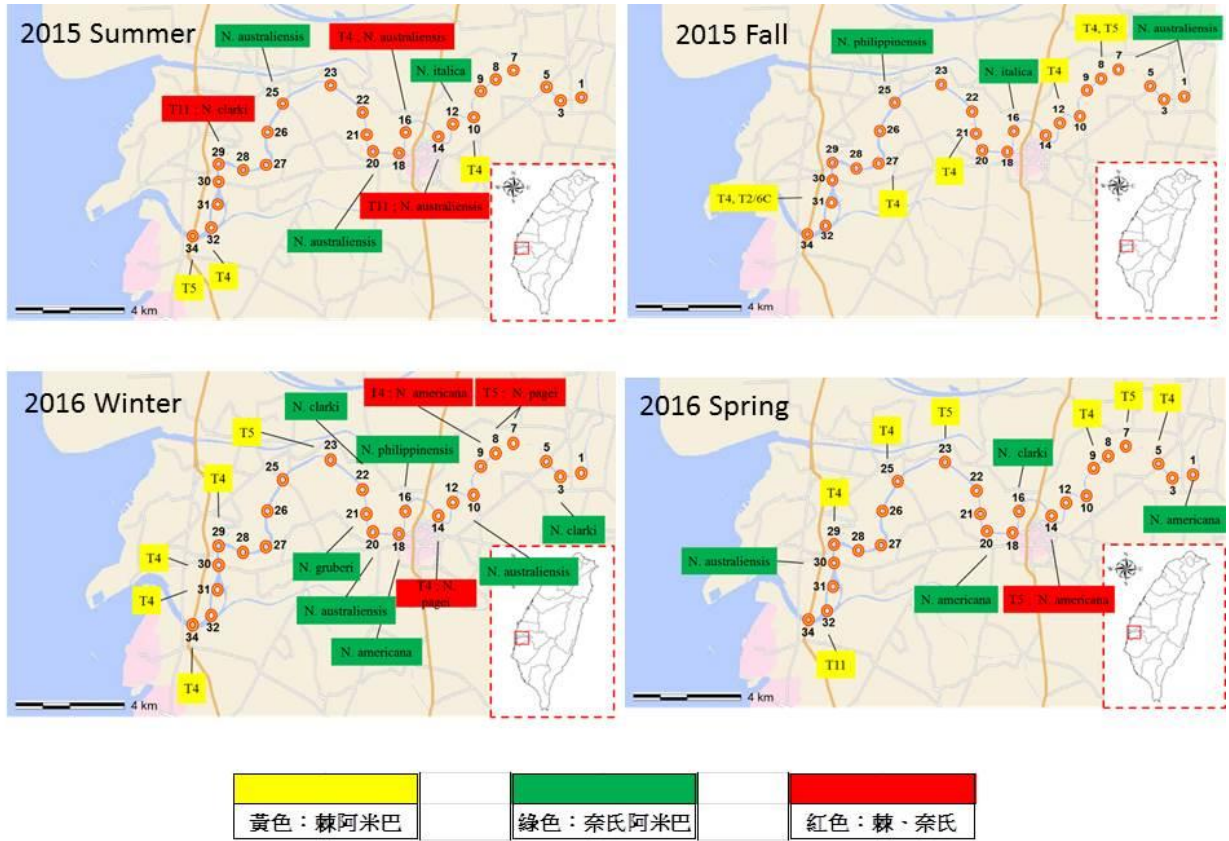


圖 18、兩種自由營生阿米巴原蟲於朴子溪流域不同季節之地理分布圖

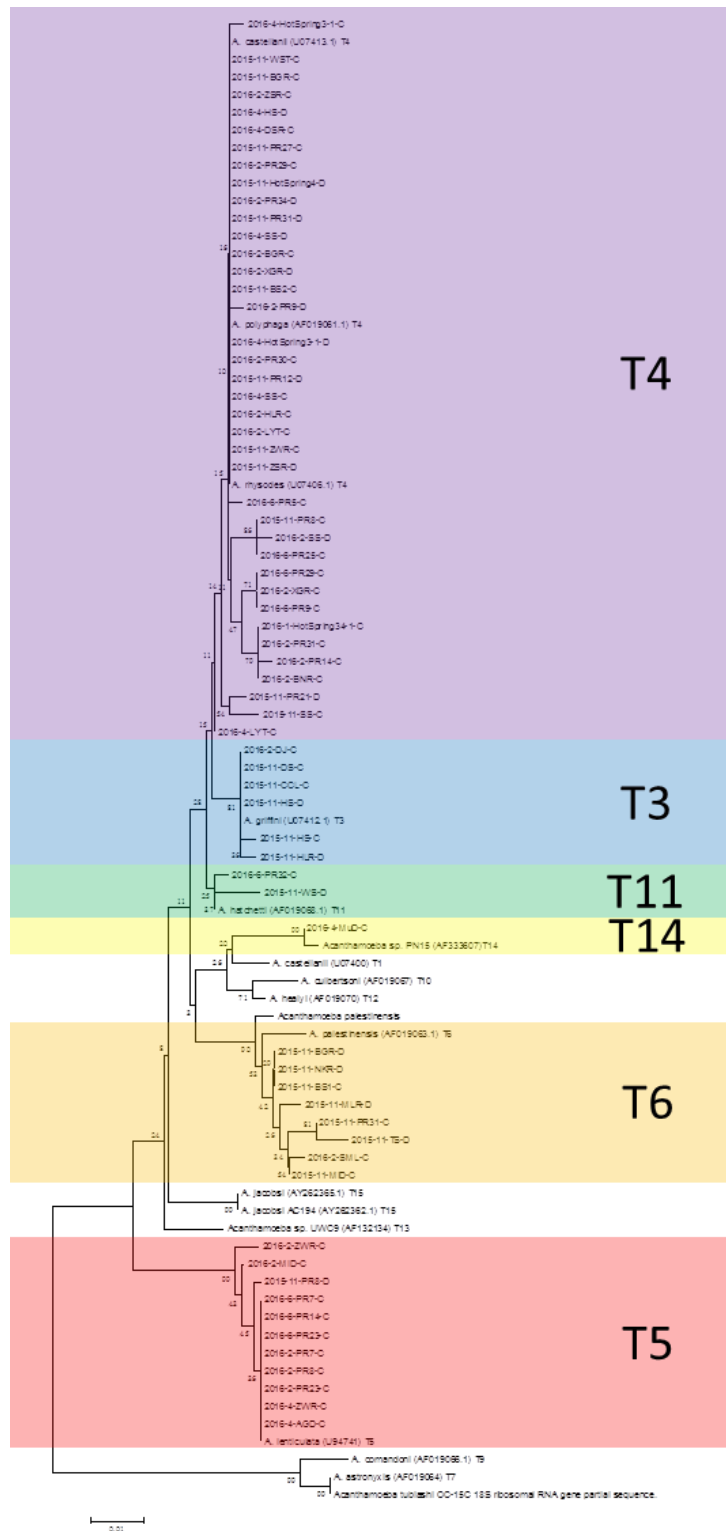


圖 19、棘阿米巴原蟲 JDP 基因區間序列親源演化分析圖

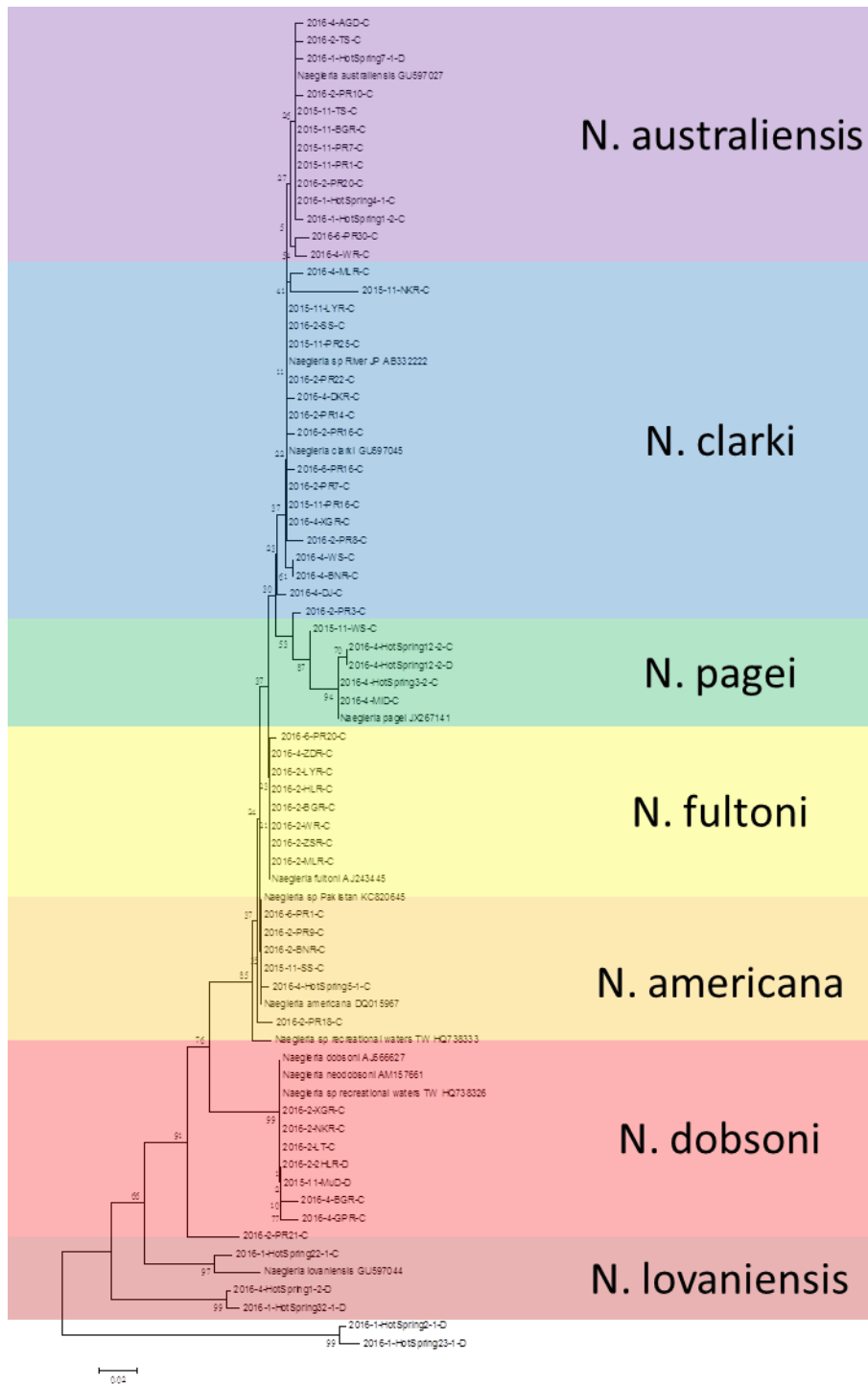


圖 20、奈格里阿米巴原蟲 ITS 基因區間序列親源演化分析圖

表 8、河川水庫樣本中棘阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	A-Positivity sample (n=45) Range	A-negativity sample (n=83) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.875	0-440,000	0-762,000
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i>=0.022	0-5,925	0-28,000
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.120	0-5,050	0-5,110
溫度(°C)	<i>p</i> =0.666	14.3-32.3	14.6-34.3
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.415	1-746	0.51-718
總懸浮固體(mg/L)	<i>p</i> =0.704	1.2-1,110	1.2-1,330
導電度(μ mho/cm25°C)	<i>p</i> =0.834	86-52,300	98-45,400
pH	<i>p</i> =0.234	7-9.7	7.4-9.8
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.348	0.5-137.2	18.2-166
溶氧量(mg/L)	<i>p</i>=0.047	0-11	1.6-12
化學需氧量(mg/L)	<i>p</i> =0.909	0.4-61.9	3.7-37.9
氨氣(mg/L)	<i>p</i> =0.440	0.01-3.68	0.01-6.2
			Significant <i>p</i> <0.05; A for Acanthamoeba

表 9、河川水庫樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	N-Positivity sample (n=34) Range	N-negativity sample (n=94) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.408	0-53,933	0-762,000
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.336	0-13,300	0-28,000
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i>=0.008	0-5,050	0-5,110
溫度(°C)	<i>p</i>=0.007	14.6-32.3	14.3-34.3
濁度(NTU)	<i>p</i>=0.002	2.5-746	0.51-718
總懸浮固體(mg/L)	<i>p</i><0.001	1.3-1,330	1.2-746
導電度(μ mho/cm25°C)	<i>p</i> =0.375	107-5,210	86-52,300
pH	<i>p</i>=0.048	7.5-9.2	7-9.8
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.095	0.5-148.4	18.2-166
溶氧量(mg/L)	<i>p</i> =0.734	0-12	1.6-11.8
化學需氧量(mg/L)	<i>p</i>=0.071	4.0-61.9	3.7-51
氨氣(mg/L)	<i>p</i><0.001	0.01-6.2	0.01-4.91
			Significant <i>p</i> <0.05; N for Naegleria

表 10、朴子溪樣本中棘阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	A-Positivity sample (n=29) Range	A-negativity sample (n=67) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.386	0-235,000	0-565,333
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.054	0-14,360	15-48,200
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.076	0-740	0-520
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.418	12.64-66.9	6.46-94.3
溫度(°C)	<i>p</i> =0.171	12.3-32.3	14.6-32.9
鹽度(‰)	<i>p</i>=0.038	0.25-30.3	0.2-30.4
pH	<i>p</i> =0.820	7.28-9.57	7.23-9.72
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.585	0.5-30.8	0-42.6
			Significant <i>p</i> <0.05; A for Acanthamoeba

表 11、朴子溪樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	N-Positivity sample (n=26) Range	N-negativity sample (n=70) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.118	0-400,000	0-565,333
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.436	0-20,400	0-482,00
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.738	0-740	0-425
溫度(°C)	<i>p</i> =0.296	12.3-31.5	13.5-32.9
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.111	13.77-76.5	6.46-94.3
鹽度(‰)	<i>p</i>=0.01	0.2-25.2	0.22-30.47
pH	<i>p</i> =0.776	7.22-9.72	7.13-9.57
溶氧飽和度(%)	<i>p</i><0.001	4.6-20.5	0-42.6
			Significant <i>p</i> <0.05; N for Naegleria

表 12、溫泉樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	N-Positivity sample (n=9) Range	N-negativity sample (n=72) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i>=0.001	0-167,000	0-272,000
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i>=0.002	0-2,148	0-662
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i>=0.001	0-474	0-116
溫度(°C)	<i>p</i>=0.045	24-56	26-92
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.939	0.38-152	0.1-202
導電度(μmho/cm25°C)	<i>p</i><0.001	0.36-0.71	0.05-11.77
pH	<i>p</i> =1	7.75-9.54	2.08-10.54
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.946	40.6-50.2	37.1-61.3
			Significant <i>p</i> <0.05; N for Naegleria

表 13、綜合水體樣本中棘阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	A-Positivity sample (n=76) Range	A-negativity sample (n=229) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.097	0-235,000	0-565,333
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.543	0-30,120	0-48,200
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.723	0-5,050	0-5,110
溫度(°C)	<i>p</i> =0.282	12.3-32.3	14.6-34.3
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.416	1-746	0.51-718
鹽度(‰)	<i>p</i> =0.084	0.25-29.11	0.05-30.47
pH	<i>p</i> =0.426	7-9.7	7.23-9.8
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.352	0-137.2	0-166
			Significant <i>p</i> <0.05; A for Acanthamoeba

表 14、綜合水體樣本中奈格里阿米巴原蟲檢出率與水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	N-Positivity sample (n=69) Range	N-negativity sample (n=236) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i><0.001	0-400,000	0-565,333
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i><0.001	0-30,120	0-48,200
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i>=0.009	0-5,050	0-5,110
溫度(°C)	<i>p</i><0.001	14.6-56	14.3-92
濁度(NTU)	<i>p</i><0.001	0.38-746	0.1-718
鹽度(‰)	<i>p</i>=0.019	0.2-25.2	0.22-30.47
pH	<i>p</i>=0.025	7.22-9.72	2.08-10.54
溶氧飽和度	<i>p</i>=0.001	0-125	0-166
			Significant <i>p</i> <0.05; N for Naegleria

表 15、綜合水體樣本中棘阿米巴原蟲致病基因型與非致病基因型間之水質指標檢定分析結果表(2015-2016)

Water quality indicators	Mann-Whitney <i>U</i> test	A-致病型別 sample (n=38) Range	A-非致病型別 sample (n=7) Range
Heterotrophic plate count (CFU/ml)	<i>p</i> =0.902	0-440,000	1666-14,000
Total Coliform (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.728	0-5,925	50-1,580
<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	<i>p</i> =0.814	0-122	0-5,050
溫度(°C)	<i>p</i> =0.908	14.3-31.1	18-32.3
濁度(NTU)	<i>p</i> =0.136	1-746	9.44-496
總懸浮固體(mg/L)	<i>p</i> =0.681	1.2-1,110	1.3-657
導電度(μmho/cm25°C)	<i>p</i> =0.392	86-43,500	107-52,300
pH	<i>p</i> =0.843	7-9.7	7.5-8.5
溶氧飽和度(%)	<i>p</i> =0.543	0.5-137.2	71-115.6
溶氧量(mg/L)	<i>p</i> =0.135	0-11	6.6-8.5
化學需氧量(mg/L)	<i>p</i> =0.712	4.3-61.9	5-15.7
氨氣(mg/L)	<i>p</i> =0.798	0.01-3.68	0.01-0.27
			Significant <i>p</i> <0.05; A for Acanthamoeba

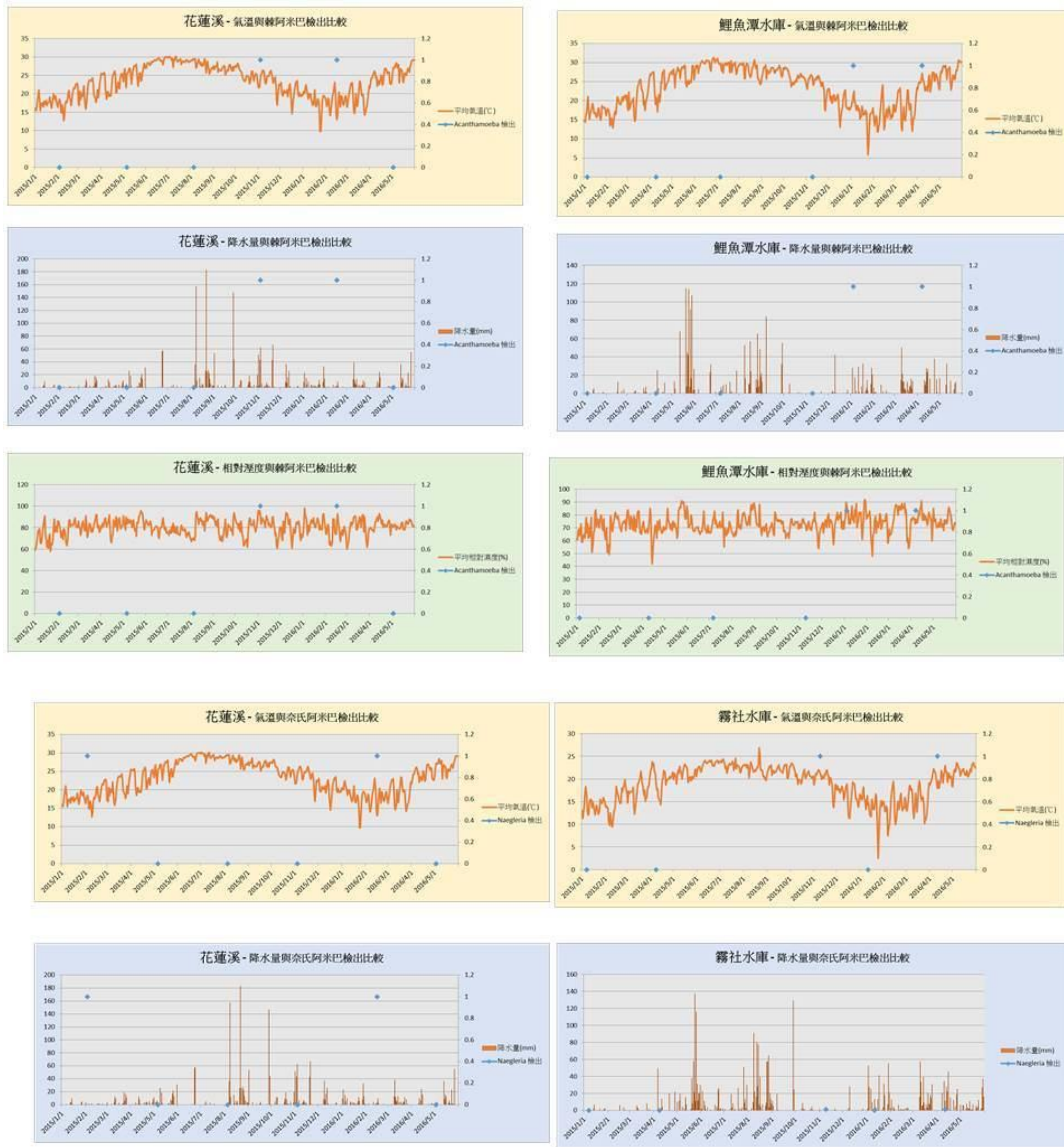


圖 21、兩種自由營生阿米巴原蟲氣候因子與檢出率分析探討示意圖

表 16、水庫水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表 (2015-2016)

Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.055	1.655	0.198	0.932	0.836	1.038	0.633
3天平均氣溫 (°C)	0.059	2.160	0.142	0.917	0.817	1.029	0.654
當天相對濕度(%)	0.055	6.119	*0.013	1.145	1.028	1.274	0.788
3天平均相對濕度(%)	0.070	9.231	**0.002	1.237	1.078	1.418	0.788
當天降雨量(mm)	0.049	5.068	*0.024	1.115	1.014	1.227	0.598
3天平均降雨量(mm)	0.057	11.608	***0.001	1.214	1.086	1.357	0.736
3天累積降雨量(mm)	0.019	11.608	***0.001	1.067	1.028	1.107	0.736
當日日照時數(hr)	0.092	3.314	0.069	0.846	0.706	1.013	0.629
3天平均日照時數(hr)	0.135	6.688	**0.010	0.705	0.541	0.919	0.716
3天累積日照時數(hr)	0.045	6.688	**0.010	0.890	0.815	0.972	0.716
當日日照量(MJ/m2)	0.047	2.928	0.087	0.922	0.840	1.012	0.648
3天平均日照量	0.069	7.504	**0.006	0.828	0.723	0.948	0.767
3天累積日照量	0.023	7.504	**0.006	0.939	0.898	0.982	0.767

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^{*}<0.05$

表 17、水庫水體樣本中棘阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

<i>Acanthamoeba</i> (Hosmer-Lemeshow test p -value >0.05)							
Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.038	1.315	0.251	1.044	0.970	1.124	0.556
3天平均氣溫 (°C)	0.040	0.946	0.331	1.040	0.961	1.125	0.545
當天相對濕度(%)	0.028	0.129	0.719	1.010	0.956	1.067	0.541
3天平均相對濕度(%)	0.033	0.684	0.408	1.028	0.963	1.097	0.544
當天降雨量(mm)	0.024	0.364	0.546	0.986	0.940	1.033	0.545
3天平均降雨量(mm)	0.030	0.298	0.585	1.016	0.959	1.077	0.501
3天累積降雨量(mm)	0.010	0.298	0.585	1.005	0.986	1.025	0.501
當日日照時數(hr)	0.055	0.400	0.527	0.966	0.868	1.075	0.531
3天平均日照時數(hr)	0.069	0.397	0.529	0.957	0.836	1.096	0.54
3天累積日照時數(hr)	0.023	0.397	0.529	0.986	0.942	1.031	0.54
當日日照量(MJ/m2)	0.029	0.029	0.865	0.995	0.939	1.054	0.516
3天平均日照量	0.034	0.142	0.706	0.987	0.924	1.055	0.523
3天累積日照量	0.011	0.142	0.706	0.996	0.974	1.018	0.523

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^* < 0.05$

表 18、溪流水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

<i>Naegleria</i> (Hosmer-Lemeshow test p -value >0.05)							
Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.059	4.678	* 0.031	0.879	0.783	0.988	0.676
3天平均氣溫 (°C)	0.066	4.761	* 0.029	0.865	0.760	0.985	0.68
當天相對濕度(%)	0.045	2.572	0.109	1.075	0.984	1.173	0.631
3天平均相對濕度(%)	0.044	1.180	0.277	1.049	0.962	1.143	0.596
當天降雨量(mm)	0.032	1.473	0.225	0.962	0.904	1.024	0.507
3天平均降雨量(mm)	0.035	0.214	0.644	0.984	0.919	1.054	0.506
3天累積降雨量(mm)	0.012	0.214	0.644	0.995	0.972	1.018	0.506
當日日照量(MJ/m2)	0.063	2.515	0.113	0.063	2.515	0.113	0.621
3天平均日照量	0.048	1.814	0.178	0.937	0.853	1.030	0.597
3天累積日照量	0.016	1.814	0.178	0.979	0.948	1.010	0.597

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^* < 0.05$

表 19、溪流水體樣本中棘阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

<i>Acanthamoeba</i> (Hosmer-Lemeshow test p -value >0.05)							
Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.053	0.276	0.599	0.972	0.876	1.079	0.526
3天平均氣溫 (°C)	0.060	0.029	0.866	1.010	0.899	1.135	0.511
當天相對濕度(%)	0.043	1.652	0.199	0.946	0.869	1.030	0.565
3天平均相對濕度(%)	0.043	0.298	0.585	0.977	0.899	1.062	0.511
當天降雨量(mm)	0.021	1.246	0.264	1.024	0.982	1.067	0.538
3天平均降雨量(mm)	0.034	0.119	0.730	0.984	0.919	1.054	0.533
3天累積降雨量(mm)	0.011	0.338	0.561	1.007	0.985	1.029	0.35
當日日照時數(hr)	0.057	0.182	0.670	0.976	0.872	1.092	0.507
3天平均日照時數(hr)	0.078	0.028	0.867	1.013	0.870	1.179	0.539
3天累積日照時數(hr)	0.026	0.028	0.867	1.004	0.955	1.057	0.539
當日日照量(MJ/m2)	0.038	0.014	0.906	1.004	0.933	1.082	0.518
3天平均日照量	0.045	0.273	0.601	1.024	0.937	1.119	0.529
3天累積日照量	0.026	0.028	0.867	1.004	0.955	1.057	0.539

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^* < 0.05$

表 20、綜合水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表 (2015-2016)

<i>Naegleria</i> (Hosmer-Lemeshow test p -value >0.05)							
Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.037	4.185	* 0.041	0.927	0.862	0.997	0.634
3天平均氣溫 (°C)	0.041	4.728	* 0.030	0.915	0.845	0.991	0.645
當天相對濕度(%)	0.033	8.330	** 0.004	1.100	1.031	1.174	0.689
3天平均相對濕度(%)	0.037	9.210	** 0.002	1.117	1.040	1.200	0.689
當天降雨量(mm)	0.018	0.257	0.612	1.009	0.975	1.045	0.492
3天平均降雨量(mm)	0.027	4.728	* 0.030	1.061	1.006	1.120	0.581
3天累積降雨量(mm)	0.009	4.728	* 0.030	1.020	1.002	1.039	0.581
當日照時數(hr)	0.053	2.482	0.115	0.920	0.829	1.021	0.581
3天平均日照時數(hr)	0.072	5.883	* 0.015	0.839	0.729	0.967	0.637
3天累積日照時數(hr)	0.024	5.883	* 0.015	0.943	0.900	0.989	0.637
當日照照量(MJ/m ²)	0.029	2.882	0.090	0.952	0.900	1.008	0.596
3天平均日照量	0.036	6.928	** 0.008	0.909	0.846	0.976	0.656
3天累積日照量	0.012	6.928	** 0.008	0.969	0.946	0.992	0.656

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^* < 0.05$

表 21、綜合水體樣本中棘阿米巴原蟲與氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

<i>Acanthamoeba</i> (Hosmer-Lemeshow test p -value >0.05)							
Parameter	S. E.	Wald Chi-Square	顯著性	OR	95% CI		Area Under Curver (ROC)
					lower	upper	
當天氣溫 (°C)	0.030	0.226	0.635	1.014	0.956	1.077	0.519
3天平均氣溫 (°C)	0.033	0.498	0.481	1.023	0.960	1.092	0.524
當天相對濕度(%)	0.023	1.005	0.316	1.023	0.978	1.071	0.559
3天平均相對濕度(%)	0.025	0.367	0.545	1.015	0.966	1.067	0.53
當天降雨量(mm)	0.015	0.139	0.709	1.006	0.976	1.036	0.53
3天平均降雨量(mm)	0.022	0.371	0.542	1.014	0.971	1.058	0.533
3天累積降雨量(mm)	0.007	0.371	0.542	1.005	0.990	1.019	0.533
當日照時數(hr)	0.039	1.405	0.236	0.955	0.884	1.031	0.568
3天平均日照時數(hr)	0.051	0.939	0.332	0.952	0.861	1.052	0.554
3天累積日照時數(hr)	0.017	0.939	0.332	0.984	0.952	1.017	0.554
當日照照量(MJ/m ²)	0.023	0.657	0.417	0.982	0.939	1.027	0.544
3天平均日照量	0.026	0.105	0.746	0.992	0.942	1.044	0.526
3天累積日照量	0.009	0.105	0.746	0.997	0.980	1.014	0.526

$p^{***}<0.001$, $p^{**}<0.01$, $p^* < 0.05$

表 22、水庫水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與多變項氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

Parameter	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Wald Lower bound (95%)	Wald Upper bound (95%)
當日氣溫(°C)	-0.238	1.650	0.021	0.885	-3.472	2.996
3天平均氣溫(°C)	0.159	1.726	0.009	0.926	-3.224	3.543
當天相對溼度(%)	-0.436	0.731	0.355	0.551	-1.869	0.998
3天平均相對溼度(%)	1.203	0.807	2.221	0.136	-0.379	2.785
當天降雨量(mm)	0.780	0.403	3.745	0.053	-0.010	1.570
3天平均降雨量(mm)	0.232	0.385	0.362	0.547	-0.523	0.986
當日照時數(hr)	-1.676	1.235	1.841	0.175	-4.097	0.745
3天平均日照時數(hr)	1.948	0.920	4.487	0.034	0.146	3.751
當日照照量	2.819	1.901	2.198	0.138	-0.908	6.546
三天平均日照量	-3.003	1.690	3.155	0.076	-6.315	0.310

表 23、溪流水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與多變項氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

Parameter	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Wald Lower bound (95%)	Wald Upper bound (95%)
當日氣溫(°C)	-1.174	1.117	1.106	0.293	-3.363	1.015
3天平均氣溫(°C)	1.115	1.142	0.954	0.329	-1.123	3.353
當天相對溼度(%)	0.486	0.652	0.555	0.456	-0.792	1.764
3天平均相對溼度(%)	-0.384	0.770	0.249	0.618	-1.894	1.125
當天降雨量(mm)	0.488	0.424	1.322	0.250	-0.344	1.320
3天平均降雨量(mm)	0.028	0.432	0.004	0.948	-0.818	0.874
當天日照時數(hr)	2.488	1.217	4.183	0.041	0.104	4.872
3天平均日照時數(hr)	-2.139	1.109	3.723	0.054	-4.312	0.034
當天日照量	-2.832	1.612	3.088	0.079	-5.992	0.327
三天平均日照量	3.113	1.635	3.627	0.057	-0.091	6.318

表 24、綜合水體樣本中奈格里阿米巴原蟲與多變項氣候因子邏輯斯迴歸分析結果表(2015-2016)

Parameter	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Wald Lower bound (95%)	Wald Upper bound (95%)
當日氣溫(°C)	-0.584	0.619	0.890	0.345	-1.797	0.629
3天平均氣溫(°C)	0.456	0.638	0.510	0.475	-0.795	1.706
當天相對溼度(%)	0.424	0.271	2.454	0.117	-0.106	0.954
3天平均相對溼度(%)	-0.090	0.265	0.116	0.734	-0.608	0.428
當天降雨量(mm)	-0.277	0.206	1.807	0.179	-0.682	0.127
3天平均降雨量(mm)	0.283	0.234	1.463	0.226	-0.176	0.743
當天日照時數(hr)	-0.344	0.473	0.530	0.466	-1.271	0.582
3天平均日照時數(hr)	0.460	0.425	1.168	0.280	-0.374	1.293
當天日照量	1.029	0.749	1.888	0.169	-0.439	2.497
三天平均日照量	-1.101	0.742	2.202	0.138	-2.555	0.353