

計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-112101

衛生福利部疾病管制署 104 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 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：嵇達德副教授

研究人員：陳榮盛

執行期間： 104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

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	(1)
前言	(5)
材料與方法	(13)
結果與討論	(21)
結論與建議	(35)
重要研究成果及具體建議	(37)
參考文獻	(38)
圖與表	(43)

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。自營性阿米巴原蟲也可能促進體內共生細菌的生長與提供保護，如退伍軍人桿菌(*Legionella*)。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、及奈格氏阿米巴原蟲，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、水庫飲用水源及溪流水體等三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，在168個溪流採樣本中，棘阿米巴原蟲、奈格氏阿米巴原蟲、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲和微孢子蟲的檢出率分別為34.2%、25.0%、1.7%、0.8% 和 3.3%；76個水庫飲用水源樣的檢出率分別為36.8%、11.8%、0%、0%和1.3%；69個溫泉水體樣本的檢出率分別為8.7%、29.0%、0%、0%和0%。棘阿米巴分子鑑定結果則顯示，飲用水源水庫水及溪流水體主要為*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。季節的分布上，自營性阿米巴在溪流水體與水庫水體中的檢出高峰為春季，而在溫泉水體中則為夏季，春季檢出率反而較低。以朴子溪為模型進行上、中、下游河段中棘阿米巴型別分析的結果顯示上游在冬季以*A. polyphaga*為主，春季在中游檢驗出較多樣性的棘阿米巴型別，夏季則在三個區段均有*A. hatchetti*檢出。

關鍵字: 棘阿米巴原蟲、奈氏阿米巴原蟲、梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲、微孢子蟲、溫泉、

飲用水源水庫水、溪流水體、季節

Abstract:

Acanthamoeba spp., and *Naegleria* spp. are free-living amoebae, ubiquitous in aquatic environments. Several species within these genera are recognized as potential opportunistic human pathogens. These free-living amoebae may facilitate the proliferation of their facultative endosymbiotic bacteria, such as *Legionella*. In this study, we identified *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia* using various analytical procedures and investigated their occurrence at three different water source areas (included hot spring water, drinking source water and stream water) in Taiwan. The detection results showed that stream water was collected from 168 sites and *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia* were detected in 34.2%, 25.0%, 1.7%, 0.8% and 3.3%, respectively ; drinking source water were detected in 36.8%, 11.8%, 0%, 0% and 1.3%, respectively ; hot spring water were detected in 8.7%, 29.0%, 0%, 0% and 1.3%, respectively. 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. The correlation of seasons and detection rate of Free-living amoeba showed that the high detection rate was in springtime at drinking source water and stream water, but it's lower detection rate at hot spring water in the same season. This survey confirms that pathogenic free-living amoebae *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Microsporidia* are prevalent in these Taiwanese three types of water source areas. The presence of pathogens should be considered a potential health threat when associated with human activities in those three water areas. To analyze the Pu-zi upstream, midstream and downstream, the results showed the dominant species of were *A. polyphaga* in the upstream in the winter and found the diversity of *Acanthamoeba* spp. in

the midstream in the spring. Moreover, the *A. hatchetti* was found in the three regions of Pu-zi stream in the summer.

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

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。雖然氣候與健康之關聯性研究尚未發展成熟，對於水媒傳染病的流行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，需要各國詳加研究。

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 件因飲用水遭受汙染的疾病大流行

(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，造成棘阿米巴角膜炎(*Acanthamoeba Keratitis, AK*)、肉芽腫性阿米巴腦炎(*Granulomatous Amebic Encephalitis, GAE*)及原發性阿米巴腦膜腦炎(*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(Tung et al., 2013)。此外，台灣第一例肉芽腫性阿米巴腦炎病患則因在稻田中跌倒滄水而感染(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 (*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。除型態學分類外，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腦炎(GAE)，而 T3、T4 及 T10 型與阿米巴角膜炎(AK)有關。

奈格里阿米巴 (*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)。目前奈格里阿米巴有超過三十種以上之血清型別，但只有福氏奈格里阿米巴(*N. fowleri*)會引發急性的原發性阿米巴腦膜腦炎 (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，因此建立適合 *Naegleria fowleri* 的環境，最終會使更多人類感染到這樣致命的疾病 (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子蟲(*Vittaforma corneae*)，顯示在台灣溫泉水體中，此病原菌可能存在，故值得深入探討研究。

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(<http://health.usgs.gov/>)。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第二年度

計畫重點。本研究第一年度分析探討棘阿米巴、福氏奈格里阿米巴、微孢蟲、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。

二、材料與方法

1. 採樣地點與採樣樣本數

本研究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，於期末報告撰寫時，已針對冬春夏三季進行採樣，其中冬季到春季共連續 4 個月採樣(1-4 月)，預計 11 月 13 日進行秋季採樣，故目前合計採樣次數為 5 次，樣本數為每次 24 個採樣點，採樣點分佈如圖 2 所示，採樣點詳細經緯度與地標如表 1 所示，故目前合計 120 個水體樣本，並收集了全台四季各主要流水體樣本，合計 48 個樣本，其分佈如圖 3A 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 3B 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 4 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計畫申請書之要求，詳細採樣時間與數量分布如表 2 所示。

2. 自由營生阿米巴陽性對照組來源

來源為先前發表之台灣第一例棘阿米巴分離蟲株及台灣第一例福氏奈格里阿米巴分離蟲株(Tung et al., 2012, Liang et al., 2009)，樣本形式為 Genomic DNA，自由營生阿米巴的種類：(1) 棘阿米巴: *Acanthamoeba castellanii* T4 (2) 福氏奈格里阿米巴: *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。

4. 環境水樣棘狀阿米巴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 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。
- 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。

DNA 萃取方法測試

- A. 以冷凍加熱法 (Freeze/thaw) 破壞微生物外膜。
- B. 以 SDS 或 Lysozyme 等化學方法破壞微生物外膜。

C. 以自動核酸萃取設備 MagPurix 48 System (Zinexts Life Science Corp.)。

D. 以不同廠牌之 DNA 萃取試劑及萃取流程進行效能測試。

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(水庫自來飲用原水水源、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. 以棘阿米巴及福氏奈格里阿米巴作為對照組, 於濃縮水體樣本添加不同數量之棘狀阿米巴及福氏奈格里阿米巴原蟲, 進行 DNA 萃取, 測試其 PCR 呈陽性反應之棘狀阿米巴及福氏奈格里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。

(2) 奈格里阿米巴 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。

(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：5' -AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC-3'

5'-GAGGCCGCCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'

內引子：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)。

(4) 隱孢子蟲 COWP gene 引子之 PCR 條件

CRY-9：5' -GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3'

CRY-15：5' -GGA CTG AAA TAC AGGCAT TATCTT G-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 (Christen et

al.,2014)。

(5) 微孢子蟲 V1 gene 引子之 PCR 條件

C1 : 5' - CAC CAG GTT GAT TCT GCC-3'

C2 : 5' - GTG ACG GGC GGT GTC TAC-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(Ghosh and Weiss, 2009)。

8. 氣候資料收集

氣候資料來源為當日採樣觀察之記錄結果與氣象局採樣前一日與當天之氣候資料。本年度以簡單分析方法探討變異，第二年度將統整兩年蟲株檢驗結果與更深入之氣候變遷因子探討。

9. 水體中原蟲檢測下限評估

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^{-10^6} 共 7 個樣本)，結果如圖 1 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。

10. 統計檢測方法(針對水質指標與自營營生阿米巴檢出率檢定用)

本研究進行水質指標與自由營生阿米巴檢出率等相關統計方法，使用 SAS 軟體
進行分析，主要利用 Student T 進行統計檢定。

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 3 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。其他原蟲亦比照分析，得到原蟲水體濃縮檢測的偵測下限約為 100 parasites/L，1 parasite/PCR reaction。

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. 不同來源環境水體中原蟲檢出率

(1) 朴子溪水體中原蟲檢出率

朴子河流域冬、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，

進行自營性阿米巴原蟲、隱孢子蟲、梨形鞭毛蟲及微孢子蟲檢測。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)；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)；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)。

從上述結果發現不論朴子溪單一流域或多個流域的綜合觀察，棘阿米巴的檢出率是相近，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營性阿米巴沖出帶入水體 (Dennis and Gayle, 1985)，台灣屬降雨豐沛地區，可能持續將土壤中之自營性阿米巴帶入河川中，故有較高檢出率。然而棘阿米

巴某些行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，棘阿米巴可做為多種微生物的自然宿主 (Siddiqui and Khan, 2012)，如退伍軍人菌可能致病，因此溪流或水庫中存有棘阿米巴，但後續使用水源時，若消毒不完善，棘阿米巴體內共生的病原體則可能藉由水而傳染到人群中，故台灣自然環境中棘阿米巴體內的共生菌相也是值得深入探討的議題。

而奈格里阿米巴在朴子溪的檢出率亦高達 30% 以上與棘阿米巴相當，但綜合流域的檢出率卻為 16.7%，低於棘阿米巴，顯示在台灣地區河流中的分布不平均，可能集中在某些流域。再與先前法國溪流中奈格里阿米巴的檢出率 9.6% 及美國的 46% 相比，顯示奈格里阿米巴分布確有地域的差別。然而，但此類奈格里阿米巴中只有一種福氏奈格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*) 可感染人類引起疾病，其他型別與人類疾病較無相關，本研究目前雖未偵測到福氏奈格里阿米巴，但不可掉以輕心，福氏奈格里阿米巴仍可能因為在環境中的蟲量遠少於其他奈格里阿米巴而被遮蔽，無法檢驗出來。同時，奈格里阿米巴在環境中的分佈變異較大，可與棘阿米巴比較，來探討氣候環境變遷之影響。

隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲均由糞便汙染而傳播，若水體中發現，則顯示水體短期間內遭到糞便之汙染，故可把此兩類原蟲當為水體之受外在汙染之指標，來探討水體是否遭受糞便汙染。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汙染的問題，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. bienersi*、*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。

(2) 溪流水體自由營生阿米巴原蟲檢出率與季節相關性分析

如圖 5 及圖 6 所示，棘阿米巴不論在單一溪流或綜合溪流分析都可發現冬季的檢出率較低，春天後檢出率才有上升的趨勢，以朴子溪流域分析，3 月與 4 月份採樣適逢梅雨季節，雨量小但是持續，亦發現此時段檢出率較高，而夏季常有午後雷陣雨或颱風，而 8 月份採樣時前幾日均為午後雷陣雨的氣候型態，可在短時間內產生大量雨水造成沖刷，而 1 月及 2 月份在朴子溪地區均屬於冬季無雨乾燥型氣候，故從單一流域結果可發現降雨可能與棘阿米巴的存在高度相關性，但仍需持續分析研究與氣候相關性。此外，以全台流域四季結果來看，棘阿米巴雖然在冬季檢出率相對較低而在其他季節則較高。但進一步分析冬季檢出的地點發現，6 個陽性樣本有 4 個樣本來自於北部地區，然而北部地區冬季受到東北季風影響，屬於冬季多雨但雨小

的氣候型態，綜合以上結果，初步認為棘阿米巴與降雨有著一定程度的相關性，可能因為雨水將環境中的棘阿米巴持續沖刷入河川中，但水量太大時則會直接將棘阿米巴帶走流入海中，值得後續研究探討。但除了與降雨有關外，亦可能與氣溫有關，比較國外的研究發現，詹姆斯河流域在不同季節檢出率是有所差異，在春季與夏季檢出率較高，與本研究結果相似，而其作者認為此現象與溫度有關，因棘阿米巴原蟲主要活動環境是偏向溫暖氣候，但其與溫度相關或與降雨相關仍需更進一步分析探討。奈格里阿米巴在不同季節上不論單一流域或綜合流域分析均無較大之變異，顯示其可能為水體中相對穩定不亦受到降雨影響之蟲株，而對其影響之因子仍需更深入的研究，在國外研究意有相同結果(Corsaro et al., 2010)。

(3) 溪流水體棘阿米巴原蟲檢出型別

從表 4 及表 5 的結果分析，可發現與人類疾病相關的棘阿米巴型別，主要為 T4 genotype、*A. polyphaga* 及 *A. castellanii* 這三種，其他型別例如 T5 等亦有感染風險，而本次結果可以發現在溪流水體中，普遍有此類具感染風險型別的蟲株存在，這是值得關注與探討的環境公共衛生議題。而從季節的變化上來分析，棘阿米巴在全台溪流部分的冬季均無檢出，其中淡水河在其他三季均有檢出，但每季的型別均不同，顯示在不同季節同一流域的檢驗上，棘阿米巴的存在型別不同，而部分溪流只在某些季節有被檢出棘阿米巴，這與地理位置或氣候相關性還需後續更多資料分析探討。此外，在貓羅溪的部分在春秋兩季有被檢出，而型別均為 *A. lenticulata*，而濁水溪在夏秋兩季有被檢出，且型別均為 *A. genotype T4*，顯示在這兩流域有主要型別的棘阿米巴存在，此兩溪流與淡水河結果不同，是否是地理位置與氣候因素所影響或者是

來自於其周遭土壤環境差異，是需要更多氣候資訊來輔助分析探討，期望於第二年度計畫仍針對此結果進行分析探討。

朴子溪流的不同月份季節與採樣點的棘阿米巴型別檢測上結果如表 5 所呈現，其 P29 採樣點在 1 月、3 月及 8 月這三個冬春夏季節均有發現棘阿米巴的存在，但這三次檢驗結果型別均不相同，而整體流域的型別上是具有多樣性的但仍有幾種型別為主要常見之型別，如：*A. castellanii*、*A. polyphaga* 及 *A. hatchetti* 等，而其與氣候或周遭土壤之相關性將持續研究分析。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，特別是下有是台灣重要的文蛤牡蠣養殖區，當水體滲入或有傷口都可能造成棘阿米巴感染，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營性阿米巴原蟲(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) 飲用水源水庫水體原蟲檢出率

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)；隱孢子蟲及梨形鞭毛蟲的直接濃縮法檢出率皆為 0% (0/76)；微孢子蟲的直接濃縮法檢出率為 1.3% (1/76)。

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是廣泛存在的，對比 Leiva 等人於 2007 年在尼加拉瓜及 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，如表 6 所示。表 6 同樣顯示奈格里阿米巴檢驗結果與本土及國外之比較，在飲用水源水庫中的檢出率均是較低的，顯示在一般水庫水源中以棘阿米巴為主要存在之自由營生阿米巴。方法學方面如同先前溪流水樣自由營生阿米巴檢出率一樣，均是以培養法為最佳檢出方法，但培養法亦受到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營性阿米巴之存在進行研究探討，在 467 戶家庭中檢測出自營性阿米巴原蟲的機率 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，棘狀阿米巴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)。

隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲在水庫水體均未被檢出，顯示台灣飲用水源並未嚴重遭受到糞便汙染，但仍需持續監測。而有一水庫樣本點檢出微孢子蟲，但與溪流水體結果相同為非致病性微孢子蟲，但同樣問題本年度計畫經費問題，故期望接續計畫可擴增檢驗型別獲得更完整數據分析。

(5) 飲用水源水庫水體自由營生阿米巴原蟲檢出率與季節相關性分析

本研究在水庫樣本棘阿米巴原蟲的季節分析，發現檢出率春季最高(48%)，如圖 7 所示。但其他季節均有 30% 以上的檢出率。水庫水源大多長期均處於蓄水狀態，與溪流型態不同，溪流受降雨影響較大，故水庫水體受何種因素影響，目前尚無較清楚之分析，是值得深入探討之議題，就目前數據及國外研究結果指出在水庫水源中棘阿米巴均維持一定程度的檢出率，而其對人類感染風險則還需透過型別分析在加探討。此外，其存在性對水庫生態微生物菌相之影響，是值得深入探討之議題。故本研究期望第二年度透過水庫周遭環境之調查與分析，並整合氣候變異與強降雨等變化來進行整合性背景分析。奈格里阿米巴原蟲在夏季無檢出，相對溪流水體同樣在夏季檢出率較低，但是否與季節有直接關係仍需進一步分析，而其他季節變化與溪流水體相似，而春季檢出率略高於其他季節，因此在水庫水源中仍以棘阿米巴原蟲為主要自由營生阿米巴物種。

(6) 水庫水體棘阿米巴原蟲檢出型別

如表 7 結果所示，在水庫水源檢出之棘阿米巴中存有高達 78.6%(22/28)與人類

致病相關的蟲株，顯示飲用水源若未善加處理仍有感染風險，因此終端用水安全仍值得關注。水庫水源中以 *A. polyphaga* 為主要型別並屬 T4 基因型，其他棘阿米巴 genotype T4 型則為造成人類引發肉芽囊腫腦炎的主要感染型別，而 *A. polyphaga* 及 *A. castellanii* 均亦與人類阿米巴性角膜炎感染有關，因台灣許多水庫兼具觀光用途，故民眾戲水遊憩時也需注意安全衛生。

季節與採樣點的分析，澄清湖除了夏季未檢出外，其他三季均有檢出，在冬季與秋季主要檢出型別為棘阿米巴 genotype T4 蟲株，在春季則為 *A. culbertsoni*，在石門水庫則只有冬季未檢出，春秋季主要檢出型別為 *A. polyphaga*，而夏季主要檢出為 *A. genotype T4*，而有兩季重複的採樣點驗出其型別均與前季不同，顯示棘阿米巴原蟲在水庫是有消長並非長期以同一種型別存在，但仍需更找尋其影響因子為何。

(7) 溫泉水體原蟲檢出率

四個季節的溫泉水體樣本合計至期末報告前，共採樣 76 個溫泉樣本，但北投溫泉秋季採樣的 7 個樣本仍在分離培養與 PCR 鑑定中，前三季監測棘阿米巴原蟲的檢出率直接濃縮法為 1.4% (1/69)，培養法為 7.2% (5/69)，總檢出率為 8.7% (6/69)；奈格里阿米巴原蟲的直接濃縮法檢出率為 5.8% (4/69)，培養法為 23.2% (16/69)，總檢出率為 29.0% (20/69)；隱孢子蟲、梨形鞭毛蟲及微孢子蟲的直接濃縮法檢出率皆為 0% (0/69)。

全年度棘阿米巴原蟲的檢出率僅有 8.7%，均較先前兩種不同水體為低，亦比先前研究發現台灣地區溫泉棘阿米巴檢出率約 21.1% 低許多 (Huang SW and Hsu BM, 2010)，但此研究是 2009 年北部溫泉的研究結果，也許是近幾年溫泉中棘阿米巴的

分佈情形有所變化。過去的研究發現奈格里阿米巴較其他自由營生阿米巴耐高溫，且某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。本研究奈格里阿米巴檢出率為 29%，相較於先前兩種水體皆有較高的檢出率，顯示奈格里阿米巴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亦高達 39.3%，而棘阿米巴檢出率僅 3.9%，顯示各個地區溫泉水體可能均以奈格里阿米巴為自由營生阿米巴的優勢種類。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，奈格里阿米巴檢出率為 35%，棘阿米巴為 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。

以溫泉區域分析，如圖 8 所示，結果發現棘阿米巴在南部與東部溫泉區均無檢出，而奈格里阿米巴檢出率分別為 53.3% 及 20%。而中部溫泉僅檢出棘阿米巴，檢出率為 20%，而奈格里阿米巴則未檢出。但因此三處溫泉本年度僅進行一次採樣，數據上可能有所偏差，需進一步探討其分布狀況，且此前兩處採樣時間均在春季，是否與季節及地理有關，目前尚無法確認。尤其疾管署曾於 2012 年度在中部溫泉區檢出奈格福式阿米巴，且造成一名病患急性腦炎(PAM)死亡，本次採樣卻未檢出奈格里阿米巴，需再加確認，故期望經費充足下可持續監控。北部溫泉區在冬春夏三季均有採樣且已分析，而結果呈現與全年度較為相近結果，且與其他國外學者研究相似，故溫泉

檢驗需長期監控為宜。

隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲在溫泉水體均未被檢出，結果與水庫水體相同，顯示台灣溫泉水可能未遭受到人或其他動物糞便污染，但仍需持續監測。而同樣未檢出微孢子蟲，但台灣溫泉中曾發現的角膜條微孢蟲 (*Vittaforma corneae*) 並未能在此次檢驗中找到。榮總眼科團隊曾針對台灣地區微孢子蟲角膜炎病患進行檢驗，發現均為角膜條微孢蟲感染，且病患均有泡溫泉習慣 (Fan et al., 2012)，故期望第二年改進 PCR 檢驗方法並進行型別分析以獲得更完整數據。

(7) 溫泉水體自由營生阿米巴原蟲檢出率與季節相關性分析(以北部溫泉為例)

由季節趨勢分析發現在春季不論棘阿米巴或奈格里阿米巴檢出率均下降，且棘阿米巴未檢出，如圖 9 所示，全年度各區棘阿米巴檢出率亦較低，而奈格里阿米巴檢出率則維持約 3 成左右，顯示溫泉水體中以奈格里阿米巴為主要自由營生阿米巴種別。棘阿米巴或奈格里阿米巴則夏季檢出率較高，但因樣本數較少而未能有定論，期望第二年度計畫可針對溫泉檢驗部分強化樣本來源，以利於了解台灣溫泉水體中自由營生阿米巴的存在情況與變化。

(8) 溫泉水體棘阿米巴原蟲檢出型別

從表 8 結果發現 104 年度台灣地區溫泉水體中的棘阿米巴型別有 *A. jacobsi*、*A. griffini* 及 *A. genotype T1* 三種，且以 *A. jacobsi* 為主，但此三種均尚未有報導指出與人類疾病有關，故應為環境菌相蟲株，但有報導指出此類棘阿米巴體內易存有退伍軍人菌，則是值得另外關切的議題。若以地區來分，北部溫泉棘阿米巴的主要型別為 *A. griffini*，而中部溫泉主要型別為 *A. jacobsi*，顯示棘阿米巴在各地溫泉皆有主要

型別存在，未來將以蟲株型別做為環境變化影響之材料，期望後續持續追蹤分析。

(9) 氣候資料(以朴子溪為例)

從圖 10 結果發現 1、2、4 及 8 月份採樣前三日皆未降雨，而 3 月份採樣當日與前一日有降細雨，棘阿米巴及奈格里阿米巴檢出率在 3 月份較皆高，未來需要更詳細的分析上中下游雨量分布與氣溫資訊。然而，目前從月累積雨量結果顯示降雨量與檢出率並無正相關性，但影響檢出率應與採樣前段日子累積雨量等氣候狀況有關，故本研究針對前一個月的累積雨量來分析，如圖 11 所示，數據來源為中央氣象局網站資訊，本年度針對前一個月雨量分析與檢出率比較發現，當前一個月累積雨量較高則下個月棘阿米巴檢出率也會較高，但仍需更完整氣候資料配合，才可獲得更完善統計分析報告，期望未來仍有充足經費進行更深入探討，並尋求與氣象單位合作，以獲得更多氣候資訊，以利於評估氣候變遷與內部存在之原蟲變化來分析大環境的變遷，將是有意義且對於氣候變異對病原體流布改變等議題是有起頭作用。

(10) 棘阿米巴型別與上、中、下游分布相關性及季節分析(以朴子溪為例)

圖 12 將朴子溪分成上、中、下游三個區段，共採取 24 個水樣點區，其中上游檢體共 7 個、中游 8 個及下游 9 個樣本。從 1 月的檢驗發現中游區段未檢出棘阿米巴，而上游及下游則各檢出 2 個陽性樣本，上游型別均為 *A. polyphaga*，下游則分別檢出 *A. castellanii* 及 *A. culbertsoni* 各一例。也發現不同區段之棘阿米巴種類並不相同，此顯示棘阿米巴並未隨著水流而移動，可能具有局部區域性。然而，2 月份僅尚在上游檢出兩個陽性樣本，型別為 *A. polyphaga* 及 *A. genotype T4* 各一例，這兩個月份皆屬於冬季樣本，故冬季在朴子河流域上游主要棘阿米巴以 *A. polyphaga* 型別為主，解冬季

檢出率以上游較高，中游冬季均未檢出。上述結果可能與周遭環境相關，中游是朴子市區為主的住宅商業用地區與農業用地，上游為畜牧養殖區域，下游為水產養殖區域與畜牧養殖混合區，畜牧養殖需要大量水體清洗排放，因此對於土壤沖刷至河道可能性增加，以導致檢出率較高是可能性之一，下游區域亦是需使用大量水體清洗養殖區域，在中游的住宅商業用地則屬於水泥建築與道路，相對存在自由營生阿米巴機率較低，且南部冬季屬於乾燥型氣候，無雨水影響下，中游地區較少會清洗翻動土壤至河道，但仍需進一步進行周遭土壤等環境調查才可獲得更完善資訊。

從3月及4月資料分析，不論在上中下游均有棘阿米巴檢出，春季屬於農業高度使用時期，且伴隨著梅雨季節來到，三個區段對於環境水體混入河道可能性大增，但從上中下游的棘阿米巴型別區分來看，此三區域與先前結果相符均為區域性型別存在，並無發現同時在三個區段發現之型別，依照經驗判斷，如雨水量較大導致河道上漲且流速增加，可能會導致3區域有主要共通型別存在，但仍需實驗室測試才可獲得更科學化分析。而較為特別的地方是，上游主要的棘阿米巴型別在春季主要為 *A.castellanii*，與冬季結果不同，反而春季下游則主要型別轉換成 *A.polyphaga*，而此型別阿米巴是否與冬季上游棘阿米巴屬於一樣蟲株，這仍需進一步使用 NGS 或其他生物技術來鑑定。然而中游的棘阿米巴型別呈現多樣性，但大多屬於非致病性棘阿米巴，期望增加長期觀察了解致病性棘阿米巴與非致病性棘阿米巴存在環境是否有所差異且關鍵因子為何？

夏季的部分可發現不論在上中下游均有 *A. hatchetti* 的檢出，夏季屬於偶有短暫午後雷陣雨及颱風短暫性大雨天氣型態，是否因此導致不論在上中下游均有同一型別

棘阿米巴檢出仍需更進一步探討，但從同一區域不同季節來分析，不同季節主要存在於某區段溪流的棘阿米巴型別不同，顯示隨著氣候不同是會有所變異，但其受何種氣候因子影響仍需更進一步實驗分析。

(11) 自由營生阿米巴檢出率與水質指標分析(以朴子溪為例)

本研究針對採集水樣進行水質指標(鹽度、溫度、pH 值、濁度及導電度)與棘阿米巴原蟲與奈格里阿米巴檢出率進行統計分析，結果本年度朴子溪流採樣這兩類原蟲檢出率與水質指標並無顯著相關($P > 0.05$)，明年度將持續進行分析檢驗，以求更完善樣本數據以探討何種因子與自由營生阿米巴陽性檢出相關。

四、結論與建議

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汙染指標，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，以尋找汙染源頭。
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。
7. 以朴子溪上、中、下游三個區域結合自由營生阿米巴型別分析是可長期監控

氣候與環境變遷對於微生物影響的良好模式。

五、重要研究成果及具體建議

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. 已建置自由營生阿米巴環境變遷與型別變異之研究模式(成果)。
3. 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)。
4. 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汙染與滄水(建議)。
5. 未來可結合臨床病理資料進行臨床與環境病原體相關性分析(建議)。
6. 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)。
7. 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. 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)。

六、參考文獻

Amorn Lekkla, Chantira Sutthikornchai, Somchai Bovornkitti and Yaowalark Sukthana (2005) Free-living ameba 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.

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.

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

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 Isendosymbiotic 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

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.

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

Leiva B, Clasdotter 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 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,

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.
- 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.
- 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).

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。

七、圖表

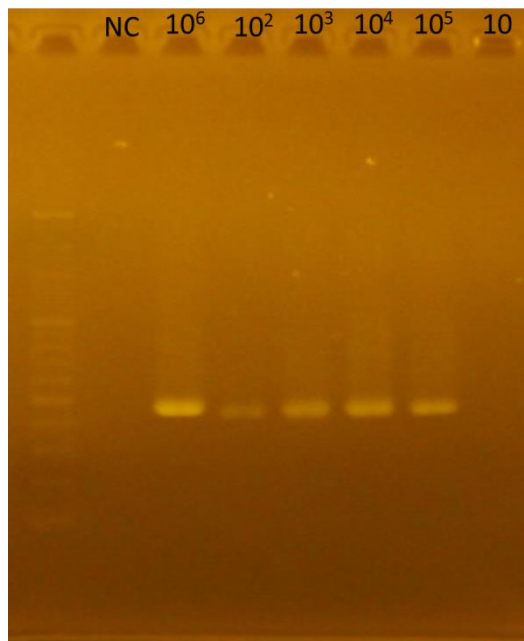


圖 1、水體原蟲回收評估之 PCR 電泳圖



圖 2、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

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

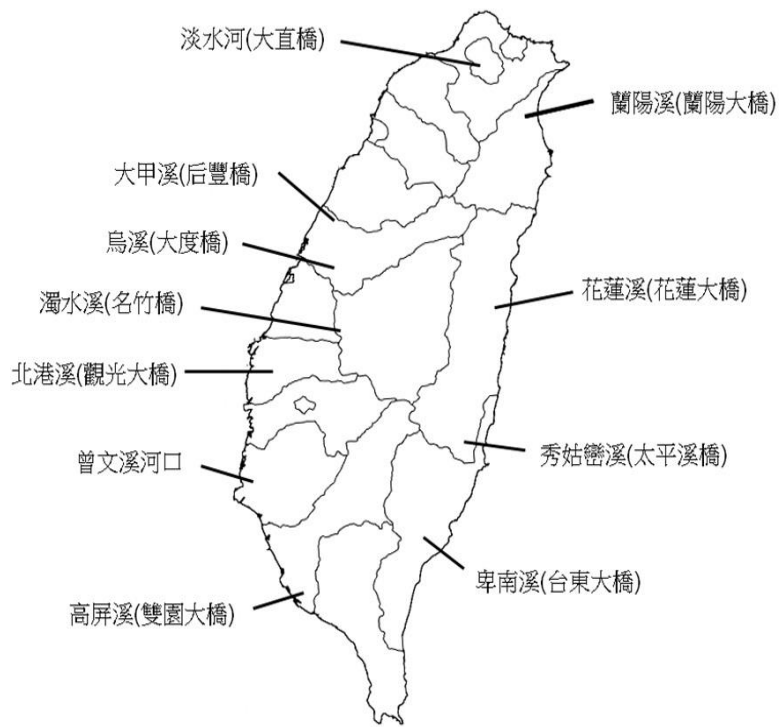


圖 3A、全台溪流採樣地點分布

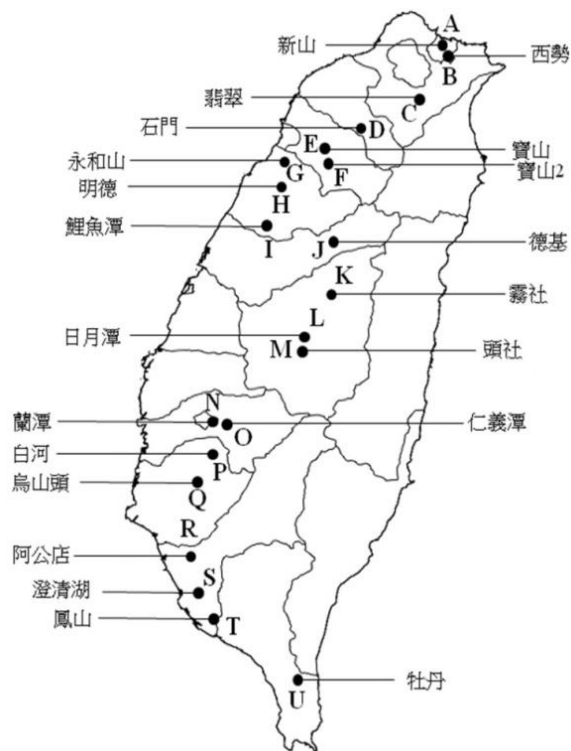


圖 3B、全台水庫採樣地點分布



圖 4、全台溫泉採樣地點分布

表 2、各水體樣本採樣日期 (月/日)

104 年度	朴子溪流	其他溪流	全台水庫	全台溫泉(區域)
冬	1/6 2/5	1/10-1/18	1/10-1/18	2/3(北投) 2/4(礁溪)
春	3/24 4/25	3/13-3/20	3/13-3/20	3/27(四重溪) 3/28(知本) 4/8(北投) 4/28(谷關)
夏	7/15	8/8-8/15	8/8-8/15	7/8(北投) 8/12(北投)
秋	11/13	10/22-10/30	10/22-10/30	10/20(北投)

表 3、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)

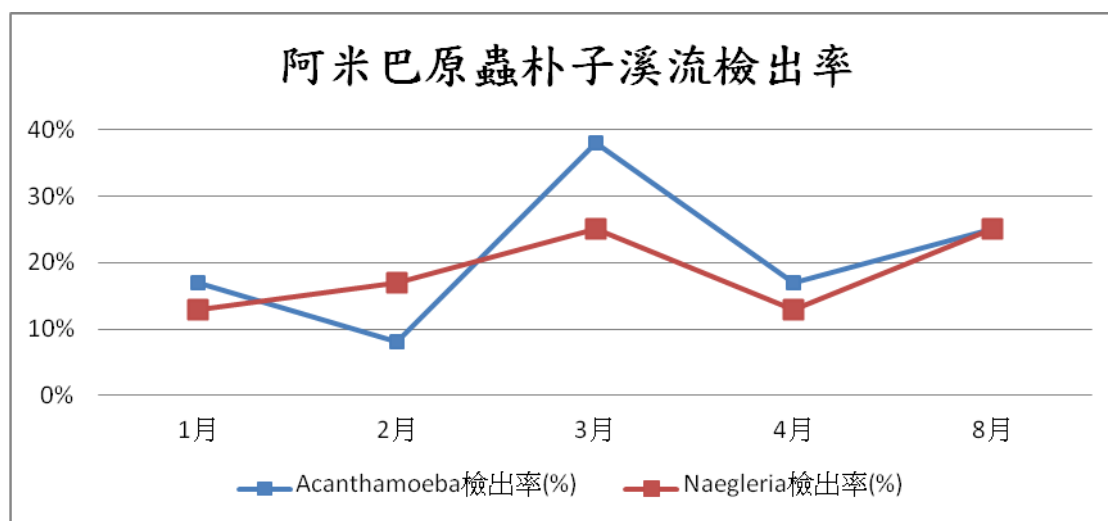


圖 5、自由營生阿米巴朴子溪流檢出率月份圖

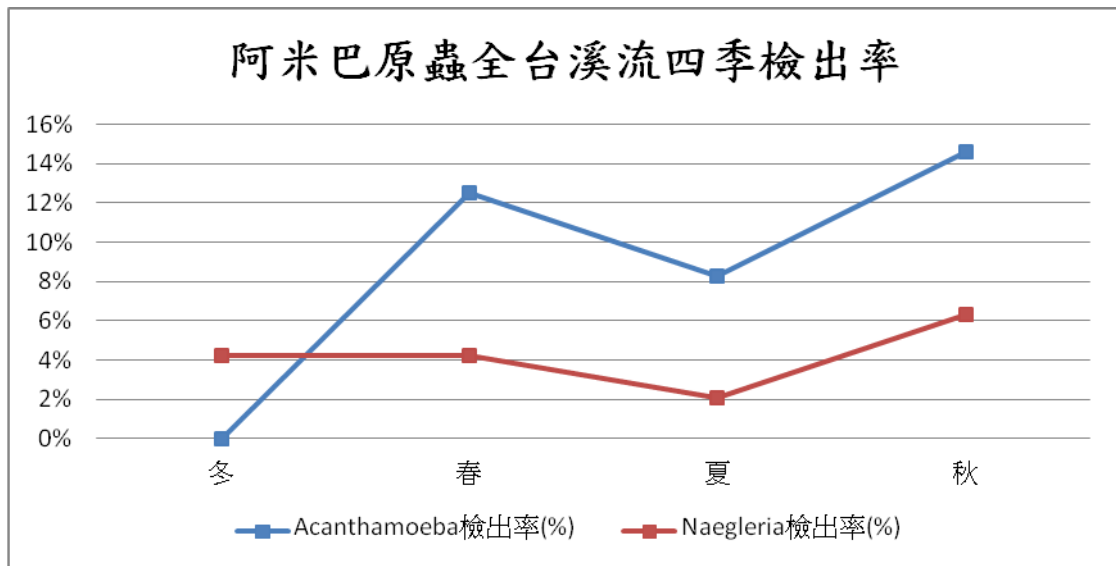


圖 6、自由營生阿米巴全台溪流季節檢出率圖

表 4 本研究全台溪流水體中棘阿米巴原蟲與 NCBI 定序分析之結果圖

本編號	相似菌種	相同度
淡水 Sp	<i>A. culbertsoni</i>	96%
花蓮 Sp	<i>A. polyphaga</i>	98%
烏溪 Sp	<i>A. hatchetti</i>	99%
高屏 Sp	<i>A. griffini</i>	99%
貓羅 Sp	<i>A. lenticulata</i>	99%
秀姑 Sp	<i>A. castellanii</i>	95%
淡水 S	<i>A.genotype T4</i>	99%
蘭陽 S	<i>A. lenticulata</i>	94%
濁水 S	<i>A.genotype T4</i>	99%
淡水 A	<i>A. hatchetti</i>	99%
蘭陽 A	<i>A.genotype T5</i>	99%
花蓮 A	<i>A. castellanii</i>	99%
北港 A	<i>A. polyphaga</i>	99%
濁水 A	<i>A.genotype T4</i>	99%

曾文 A	<i>A. polyphaga</i>	99%
南港 A	<i>A. genotype T4</i>	99%
貓羅 A	<i>A. lenticulata</i>	99%

S=夏季 A=秋季 W=冬季 Sp=春季

表 5 本研究朴子溪流水體中棘阿米巴原蟲與 NCBI 定序分析之結果圖

樣本編號	菌種	相同度
1P1	<i>A. polyphaga</i>	98%
1P5	<i>A. polyphaga</i>	99%
1P29	<i>A. culbertsoni</i>	99%
1P32	<i>A. castellanii</i>	99%
2P3	<i>A. polyphaga</i>	99%
2P9	<i>A. genotype T4</i>	99%
3P5	<i>A. castellanii</i>	99%
3P10	<i>A. lenticulata</i>	99%
3P18	<i>A. culbertsoni</i>	99%
3P22	<i>A. genotype T11</i>	97%
3P23	<i>A. palestinensis</i>	97%
3P25	<i>A. polyphaga</i>	98%
3P27	<i>A. polyphaga</i>	99%
3P29	<i>A. jacobsi</i>	98%
3P34	<i>A. polyphaga</i>	98%
4P7	<i>A. castellanii</i>	99%
4P14	<i>A. hatchetti</i>	99%
4P22	<i>A. triangularis</i>	98%
4P30	<i>A. castellanii</i>	99%
8P10	<i>A. hatchetti</i>	95%

8P14	<i>A. astronyxis</i>	97%
8P16	<i>A. hatchetti</i>	97%
8P29	<i>A. hatchetti</i>	99%
8P32	<i>A. castellanii</i>	99%
8P34	<i>A. lenticulata</i>	99%

1/P/1=月份/朴子溪/採樣點

表 6.飲用水源自由營生阿米巴檢出率比較表

國 家	水樣 種類	檢出率(%)						參考文獻
		棘阿米巴			奈格里阿米巴			
		DC	C	T	DC	C	T	
台灣	水庫	9.2%	34.2%	36.8%	1.3%	10.5%	11.8%	本研究
台灣	水庫	18.8%	30.6%	32.2%	3.2%	3.2%	3.2%	Tseng,2014
尼 加 拉 瓜	飲用水 源	48.7%	48.7%	48.7%	4.6%	4.6%	4.6%	Leiva <i>et al.</i> , 2007
英 國	飲用水 源	29.6%	NT	29.6%	11.1%	NT	11.1%	(Kilvington <i>et al.</i> , 2010)

DC:直接濃縮法 C:培養法 T:總檢出率

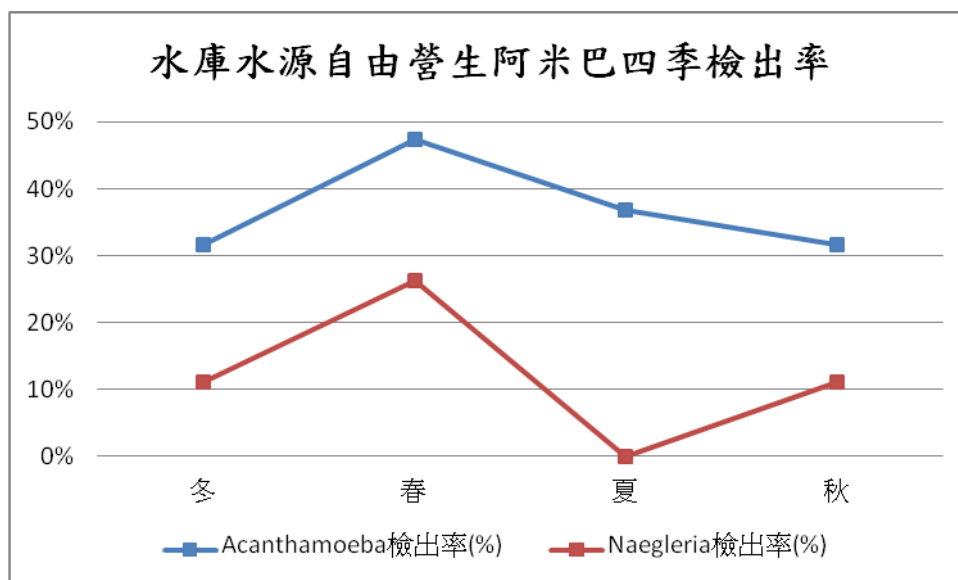


圖 7、自由營生阿米巴全台水庫季節檢出率圖

表 7 本研究全台水庫水體中棘阿米巴原蟲與 NCBI 定序分析之結果圖

樣本編號	相似菌種	相同度
澄清湖 W	<i>A. genotype T4</i>	95%
西勢 W	<i>A.castellanii</i>	96%
新山 W	<i>A. rhysodes</i>	97%
德基 W	<i>A.polyphaga</i>	96%
蘭潭 W	<i>A.griffini</i>	99%
霧社 W	<i>A.polyphaga</i>	95%
明德 Sp	<i>A.castellanii</i>	97%
石門 Sp	<i>A.polyphaga</i>	98%
澄清湖 Sp	<i>A. culbertsoni</i>	95%
德基 Sp	<i>A. triangularis</i>	98%
寶二 Sp	<i>A.polyphaga</i>	98%
日月潭 Sp	<i>A.polyphaga</i>	99%
仁義潭 Sp	<i>A.polyphaga</i>	96%
阿公店 Sp	<i>A.castellanii</i>	97%

新山 S	<i>A.castellanii</i>	95%
石門 S	<i>A. genotype T4</i>	99%
寶二 S	<i>A. genotype T4</i>	99%
德基 S	<i>A.polyphaga</i>	92%
日月潭 S	<i>A. genotype T4</i>	99%
頭社 S	<i>A. genotype T3</i>	99%
烏山頭 S	<i>A.griffini</i>	98%
曾文 A	<i>A.polyphaga</i>	95%
西勢 A	<i>A.polyphaga</i>	91%
石門 A	<i>A.polyphaga</i>	99%
寶山 A	<i>A. genotype T4</i>	99%
澄清湖 A	<i>A. genotype T4</i>	97%
仁義潭 A	<i>A.griffini</i>	98%
阿公店 A	<i>A. genotype T4</i>	98%

S=夏季 A=秋季 W=冬季 Sp=春季

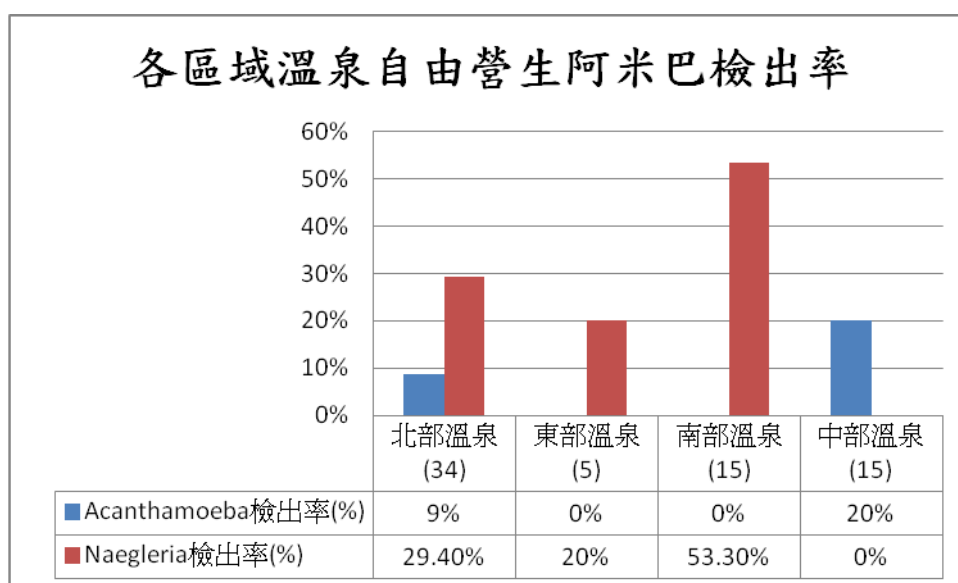


圖 8、自由營生阿米巴台灣各區域溫泉檢出率圖

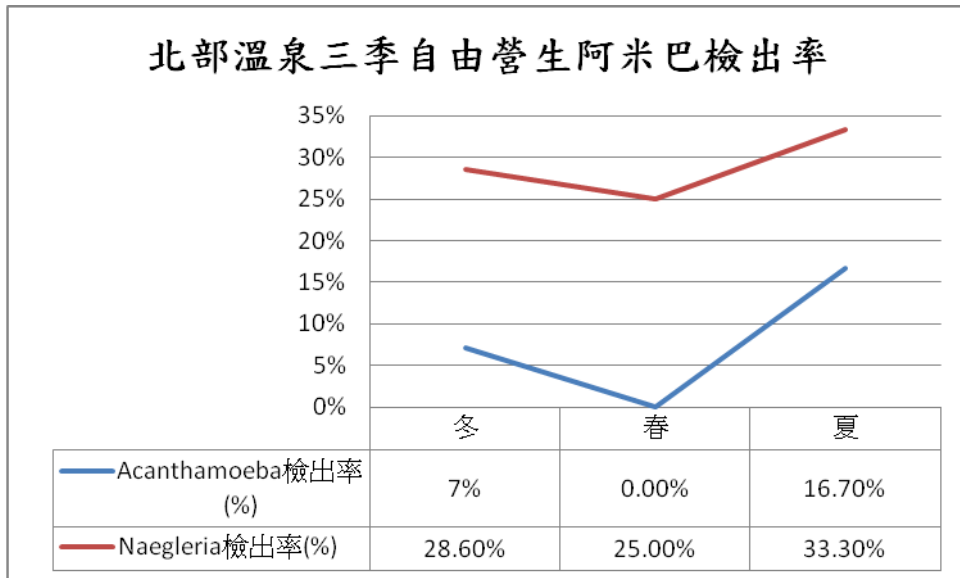


圖 9、自由營生阿米巴台灣北部溫泉不同季節檢出率圖

表 8 本研究全台溫泉水體中棘阿米巴原蟲與 NCBI 定序分析之結果圖

樣本編號	相似菌種	相同度	相似基因庫序號
N1-4	<i>A.griffini</i>	100%	GU553135
M1-2	<i>A.jacobsi</i>	98%	GU573856
M1-1	<i>A.jacobsi</i>	99%	KC164249
M1-6	<i>A.jacobsi</i>	99%	KC164249
N3-1	<i>A.griffini</i>	100%	GU553135
N3-2	<i>A. genotype T1</i>	97%	GQ924682

N:北部溫泉 M:中部溫泉

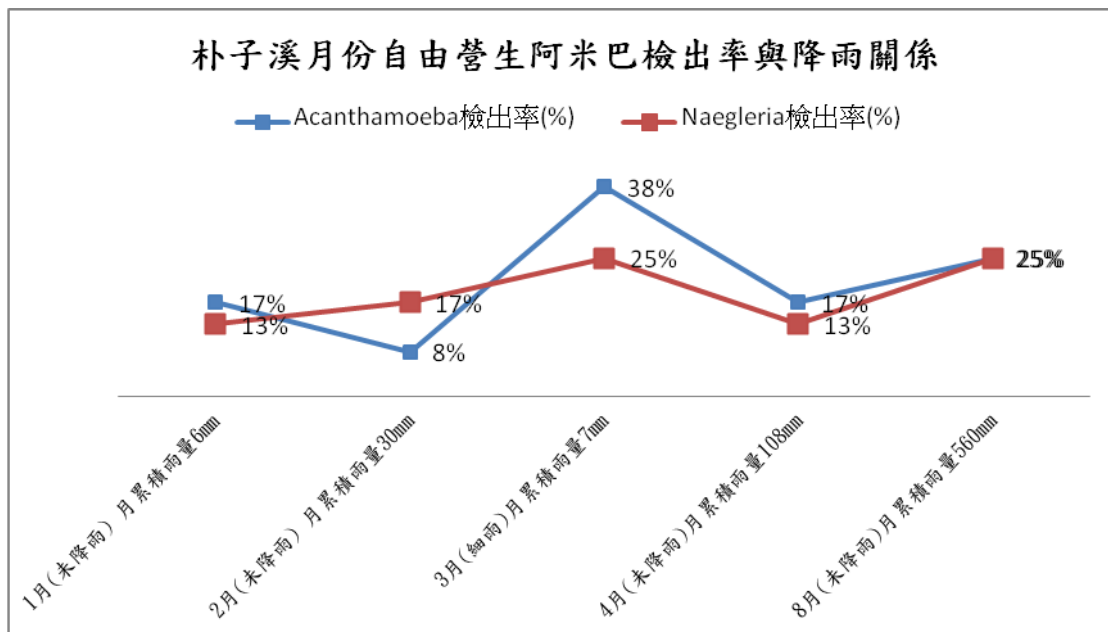


圖 10、自由營生阿米巴朴子溪檢出率與降雨關係圖

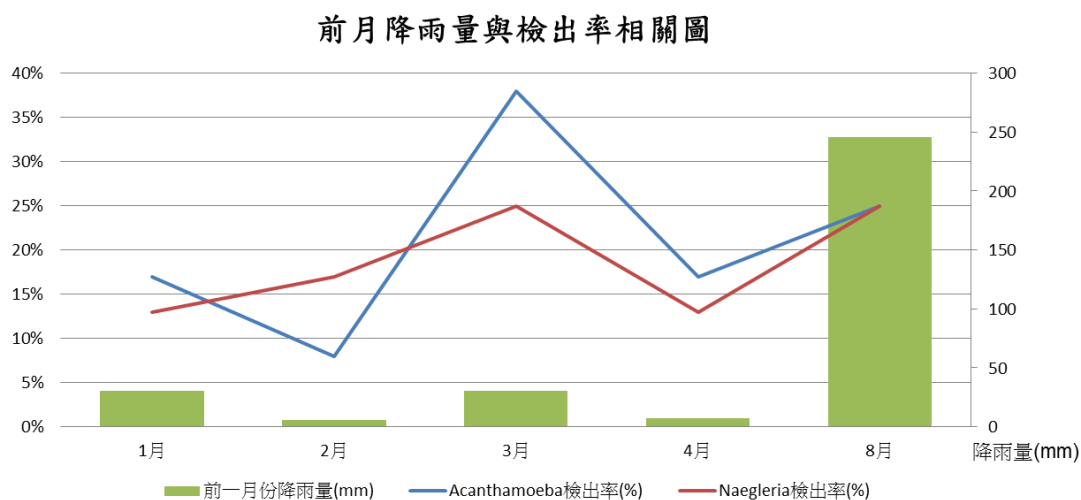
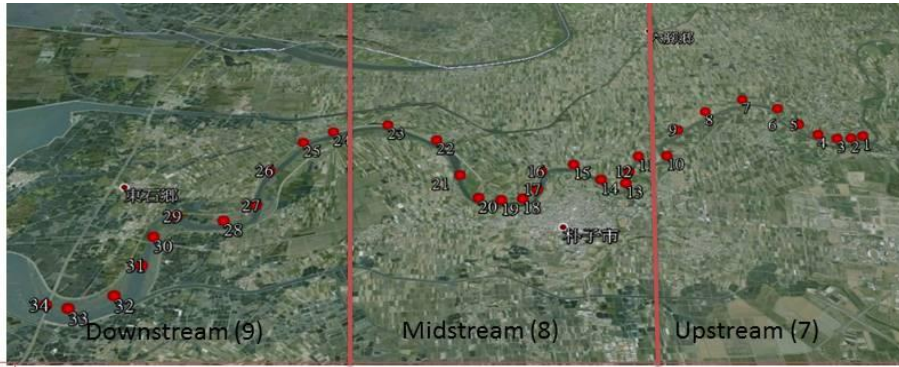


圖 11、棘阿米巴原蟲檢出率與前一月份水量累積圖



Month	Species of Acathamoeba (amount)		
January	<i>A.culbertsoni</i> (1) <i>A.castellanii</i> (1)		<i>A.polyphaga</i> (2)
February			<i>A.polyphaga</i> (1) <i>A.genotype T4</i> (1)
March	<i>A.polyphaga</i> (3) <i>A.jacobsi</i> (1)	<i>A.culbertsoni</i> (1) <i>A.genotype T11</i> (1) <i>A.palestinensis</i> (1)	<i>A.castellanii</i> (1) <i>A.lenticulata</i> (1)
April	<i>A.castellanii</i> (1)	<i>A.hatchetti</i> (1) <i>A.triangularis</i> (1)	<i>A.castellanii</i> (1)
July	<i>A.hatchetti</i> (1) <i>A.castellanii</i> (1) <i>A.lenticulata</i> (1)	<i>A.hatchetti</i> (1) <i>A.astromyxis</i> (1)	<i>A.hatchetti</i> (1)

圖 12、棘阿米巴型別於不同季節朴子溪上中下游分析圖表

行政院衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

104 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

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

主持人：嵇達德

計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-112101

1. 計畫之新發現或新發明

- a. 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。
- b. 已建置自由營生阿米巴環境變遷與型別變異之研究模式。
- c. 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。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

- a. 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汙染與滄水。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- a. 於溪流水體有檢出梨形鞭毛蟲顯示水體有遭受汙染，建議衛生環保相關單位進行汙染來源調查與研究。
- b. 朴子溪流域分析模式是良好的研究環境衛生流行病學研究模型，建議醫藥衛生單位可將臨床案例配合其周遭環境進行溯源，以利於管控疾病發生於前端。
- c. 阿米巴原蟲普遍存在於水體當中，然而是否對人類疾病感染造成問題，建議醫藥相關單位進行深入研究。
- d. 阿米巴原蟲是許多微生物在自然環境中的宿主，本研究指出水體中阿米巴原蟲屬於高檢出率蟲株，過往研究指出許多病原體會共生於阿米巴體內，例如退伍軍人菌，故其胞內菌相對疾病傳播等問題值得醫藥單位投入研究。