

計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-133303

衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫

計畫名稱：畜牧場之食媒性病原之監測與流行病學分析

106 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國立屏東科技大學 獸醫學系

計畫主持人：吳弘毅

研究人員：廖明輝、施玫玲、吳弘毅、劉世賢、葉宗明、徐翠玲

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣壹佰捌拾萬元整

\*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
摘要-----	3
壹、前言-----	7
貳、材料與方法-----	11
參、結果-----	18
肆、討論-----	22
伍、結論與建議-----	25
陸、參考文獻-----	27
柒、圖表-----	31
捌、附錄一-----	44
玖、附錄二-----	46

## 摘要

由食物媒介病原引起的臨床症狀範圍廣泛，常造成困惑。目前已知食媒性病原有31種，其中與國人健康比較有重要的病原包括病毒方面輪狀病毒(Rotavirus)和諾羅病毒(Norovirus)。細菌方面包括沙氏桿菌(*Salmonella* spp)、彎曲桿菌(*Campylobacter* spp)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、梭菌(*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*)。上述病原在動物常造成從不顯性感染到引起嚴重的臨床症狀，造成畜牧場嚴重的經濟損失。本研究目的主要為調查上述病原在本省養豬場之陽性率、危險因子分析、基因型別、親緣性關係和傳播情形。自2017年1月至2017年10月，從全省各地養豬場以逢機採樣方式採集豬隻糞便及廢水處理前、廢水處理後，進行細菌分離、培養、鑑定和抽取病原核酸以聚合酶連鎖反應檢測。截至目前，檢測結果在場陽性率輪狀病毒為8.33%、沙氏桿菌為11.1%、產氣莢膜梭菌為58.3%、困難梭菌為22.2%、彎曲桿菌為8.33%。諾羅病毒和李斯特菌則未檢出有陽性。危險因子分析從問卷調查資料中尚難確定，推測可能因是採集健康豬與採樣頭數和場次較少，另飼料中有添加抗生素和酵素與病原檢測率較少有關。在基因型別和親緣性關係方面顯示在本省豬群的相似度為86.9–91.4%，而與人的相似度為76.7–91.8%，但以輪狀病毒VP6基因有三個族群，第一群與泰國株相似度達91.3%，第二群與越南株相似度達90.3-92.7%，第三群與中國株相似度達91.8-91.9%。沙氏桿菌以脈衝式膠體電泳分析，發現只有一種血清型為 *Salmonella typhimurium* 且具有多重抗藥性。產氣莢膜梭菌分離率高，顯示本菌是汙染豬場的常在菌。彎

曲桿菌檢測率也低。至於可能傳播情形，從結果資料中亦難找出其原因，一般病原之傳播均由外面傳入(如藉由車輛運輸、人員衛生、飼料、候鳥等等)。此結果可供相關防疫單位對上述食媒性病原防治和公共衛生上的參考依據。

關鍵字：食媒性病原、畜牧場、監測、流行病學

## Abstract

The food-borne pathogens cause clinical diseases widely and always confusing among diseases. Up to date, there are 31 pathogens transmitted by food. Among them, Rotavirus, Norovirus, Salmonella spp, Campylobacter spp, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens and Clostridium difficile, are highly related to human health. These pathogens affected animals and caused subclinical infections to serious clinical diseases resulted in financial losses of livestock farms. The aim of this research is to investigate the positive rate, season positive rate, analysis of dangerous factors, genotypes, phylogenetic analysis and transmission routes of pathogens in pig farms in Taiwan. Random sampling of pig stools, wastewater from January 2015 to December 2017 were collected, then bacteria isolation, identification as well as polymerase chain reaction were performed for identification of pathogens. The positive rate for rotavirus, Salmonella spp, Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Campylobacter spp, were 8.33 %, 11.1 %, 58.3 %, 22.2 % and 8.33 % respectively. No Norovirus and Listeria monocytogenes were detected from samples. It is hard to make sure the risk factors from data analysis of questionnaires. This might result from collecting samples from healthy pigs, and limited samples from pigs and hog farms. In addition to, low detective rate of pathogens, might also result from adding antibiotics and enzyme in pig food. The genotype and phylogenetic analysis of rotavirus indicated that similar percentage of nucleotide in pigs in Taiwan and in human were 89 - 95 % and 80 - 90 % respectively. There are three genotype groups of VP6 gene in rotaviruses. The similar percentage of nucleotides between Taiwan and Thailand strains was 91.3 % of VP6 gene in rotaviruses in group I. The similar percentage of nucleotides between Taiwan and Vietnam strains was 90.3 - 92.7 % of VP6 gene in rotaviruses in group II. The similar percentage of nucleotides between Taiwan and China strains was 91.8 - 91.9 % of VP6 gene in rotaviruses in group III. Only one serotype of Salmonella typhimurium has multiple drug resistant by pulse gel electrophoresis. High positive rate of Clostridium perfringens indicated that this bacteria contaminate

commonly in pig farms. The detection rate of *Campylobacter* spp. is low. The possibility of transmission is difficult to figure out from result data. In general, the pathogens introduced from outside of pig farms into pig farms by way of vehicles, fomites carried by human and migratory birds. The current results could provide the useful information for disease prevention and treatment agency in epidemic, public health and food-borne pathogens prevention.

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

## 壹、前言

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

急性胃腸炎為全球性重要的健康衛生問題，大約有上百種疾病是透過食物為媒介所造成，包括細菌、病毒、寄生蟲、毒素及 prions 等。依據美國 CDC 於 2011 年估計全年食媒性疾病，每 6 個美國人中就有 1 個人(即 4 千 8 百萬人)感染發病，在 2013 年中有 19,056 人感染，4,200 人住院，80 人死亡。分析其病原發現前 10 名，依序是 *Salmonella* (38.2%), *Campylobacter* (34.7%), *Shigella* (12.1%), *Cryptosporidium* (6.2%), STEC non-O157 (2.91%), STEC O157 (2.9%), *Vibrio* (1.3%), *Yersinia* (0.9%), *Listeria* (0.6%), *Cyclospora* (0.1%)。而在住院的病原前 10 名，依序是 *Salmonella* (47.7%)、*Campylobacter* (24%)、*Shigella* (10.7%)、*Cryptosporidium* (5.4%)、STEC O157 (5%)、*Listeria* (2.7%)、STEC non-O157 (1.3%)、*Vibrio* (1.3%)、*Yersinia* (1.3%)、*Cyclospora* (0.1%)。造成死亡的病原前 10 名，依序是 *Salmonella* (33.8%)、*Listeria* (30%)、*Campylobacter* (15%)、*Yersinia* (5%)、*Cryptosporidium* (5%)、*Shigella* (3.8%)、STEC O157(2.5%)、STEC non-O157(2.5%)、*Vibrio* (2.5%)(14)。在韓國常見食媒性疾病由細菌感染引起的其排序為 *Salmonella* spp (20.7%)、*Vibrio* (17.4%)、*Staphylococcus* (9.7%)、

Pathogenic *E.coli* (2.4%)，在日本常見食媒性疾病由細菌感染引起的其排序為 *Vibrio*(32.2%)、*Staphylococcus* (15.9%)、*Salmonella* (14.2%)、Pathogenic *E.coli*(3.0%)(23)。

國內有關食物媒介疾病於 1977 有報告統計在 1986-1995 年間共有 852 病例，由細菌引起的爆發疾病有 555 例(65%)，分析其病原發現前六名，依序是 *Vibrio parahaemolyticus*(35.5%)、*Staphylococcus aureus*(30.5%)、*Bacillus cereus*(18.7%)、*Escherichia coli*(6.5%)、*Salmonella spp*(1.8%)、*Clostridium botulinum*(1.4%)(26)。於 2005 亦有報告統計在 1995-2001 年間共有 1171 病例，在台灣北部地區由細菌引起的爆發疾病有 735 例(62.8%)，分析其病原發現前三名，依序是 *Vibrio parahaemolyticus*(86%)、*Staphylococcus aureus*(7.6%)、*Salmonella spp*(4.9%)(33)。

目前已知食媒性病原有 31 種之多。引起食因性疾病之已知感染原中病毒性約佔 79%，細菌性只佔 14%左右，而引起嬰幼兒急性腸胃炎的病毒又以輪狀病毒 (*Rotavirus A*) 排名第一。在美國及日本流行病學調查中，輪狀病毒、杯狀病毒及星狀病毒感染多發生於較冷的月份約 10 月至隔年 4 月，腺病毒及星狀病毒全年發生率無多大差異。但在台灣地區諾羅病毒及輪狀病毒主要流行季節為 11 月到 3 月間，高峰期為 1 月份。年齡分布：輪狀病毒易感染嬰兒及小於 5 歲之幼兒；星狀病毒及腺病毒主要感染幼童，但成人及較大之孩童也可能感染，諾羅病毒則是任何年齡皆可能受到感染，諾羅病毒長於人口密集機構內，例如學校、醫院、收容機構和安養機構等爆發流行(4,27)。



最近的研究報告顯示，多起諾羅病毒引起的群聚胃腸炎與動物的諾羅病毒有關，並直接或間接的從廚師和食物檢體中檢驗出動物的諾羅病毒(30,31)，而國外的研究報告在動物有關諾羅病毒及血清盛行率的研究顯示，諾羅病毒在全世界的動物身上傳播的頻率相當的高，由於諾羅病毒可在健康和有腹瀉症狀的動物身上檢驗出來，故動物也被認為是諾羅病毒重要的感染帶毒者。此外，動物除了提供諾羅病毒一個重要的帶毒者之外，有些動物如豬還扮演諾羅病毒基因重組演化的重要宿主(5,12)。因為基因重組目前被認為是產生新滋生病毒的重要過程，且該新滋生的病毒有機會成為重要的人畜共通傳染病，因此不同物種間的病毒基因重組再度受到國際的重視，相關的流行病學研究也極需建立檢測病毒在抗原和基因方面的改變，以瞭解其盛行率和基因型別的變化及人畜共通流行的可行性，藉以提高其警覺性，防患於未來。我國疾病管制局雖有諾羅病毒盛行率的調查及社區爆發流行的報告，但在動物方面對諾羅病毒的相關研究調查報告確很稀少，而我國飼養的經濟動物和寵物數量相關龐大，急需在動物方面建立相關的流行病學資料，以便瞭解諾羅病毒此重要的人畜共通傳染病在人類和動物間交互感染的重要性。

常見發生在國人的食媒性病原及其臨床症狀如下：沙氏桿菌(*Salmonella*)：潛伏期約 6-72 小時，通常是 12-36 小時，一般臨床症狀以急性腸胃炎表現，在感染後約 6-48 小時會引起腹瀉、嘔吐、發燒、倦怠及腹部絞痛等症狀。彎曲桿菌(*Campylobacter*)：進食 2-11 天後，先出現前驅發燒和倦怠，之後腹痛、水樣腹瀉。李斯特菌(*Listeria*)：感染後依病患年齡、性別和抵抗力強弱而不同。

健康狀態良好的人，感染時可能無症狀或類似感冒的輕微發燒、頭痛或噁心、嘔吐等腸胃不適症狀，但會引起新生兒腦炎、孕婦流產和敗血症，具有潛在的死亡風險。產氣莢膜芽孢梭菌 (*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*)：潛伏期 8-22 小時，呈惡心、嘔吐、冷顫、腹痛、腹瀉、腹部痙攣等症狀。

常見發生在動物的食媒性病原及其臨床症狀如下：輪狀病毒和諾羅病毒在成年動物大都呈無症狀，但在幼年動物呈水樣、糊狀和灰白色下痢，偶而會嘔吐，脫水等症狀。沙氏桿菌 (*Salmonella* spp)：主要發生在離乳後動物，常呈兩型症狀即敗血症型：會高燒，耳、尾及腹部發紺或藍紫，之後可見水樣黃色下痢，死亡率高。腸炎型呈高熱，黃色水樣下痢，脫水和無食慾，傳播迅速。產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*)：甚急性期於出生 10 小時後發病，1-2 天內死亡，血痢，虛弱。急性期常發生於 3 日齡，呈紅褐色水樣便，含壞死灰色殘渣。亞急性期常發生於 5-7 日齡，呈持續性非出血性下痢，漸消瘦，糞便軟黃道水樣。慢性期呈間歇或持續性下痢一週，灰黃或黏液便，生長慢，數週後死亡。李斯特菌(*Listeria*)：臨床症狀呈搖擺、顫抖、後肢軟癱無力，前肢僵直，運動失調，體溫高，神經質、易興奮，敗血症，食慾降低，幼畜死亡率高，成畜具抵抗力。彎曲桿菌(*Campylobacter*)：易發生於 6-20 日齡，貧血，排黑焦油狀便，剖檢呈小腸瀰漫性出血，腸肌變厚，漿膜及腸系膜水腫。傳統上認為病毒都會有特定的感染宿主，但最近有許多文獻報告指出一些在人類分離出的病毒株，其基因序列會有動物病毒株來源，例如諾羅病毒

(37)、輪狀病毒(11,36)、E 型肝炎病毒(7)、冠狀病毒(29)。這些病毒皆為 RNA 病毒，並且可以藉由糞便排出到環境中，引起人畜共通傳染病的可能性。

## 貳、材料與方法

### 1.豬場選定：

本研究依行政院農業委員會畜牧處 105 年農業統計年報中本省各縣市豬隻的頭數與場數來採集糞便檢體數目(15)，在豬隻方面，每個豬場針對不同年齡層(哺乳期、肥育期和種豬)的豬隻進行新鮮糞便檢體的採集各 10 隻，共 30 個檢體。廢水方面，主要採集廢水前處理及廢水後處理。為瞭解上述病原的分布是否受到季節的影響，每月豬場採集三場，總共 96 個檢體。

### 2.檢體處理：

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

### 3.細菌培養、分離和鑑定：

將上述新鮮糞便檢體，依欲分離培養的細菌分別依其生長特性培養在適當的培養基中(24)。

沙氏桿菌培養：將上述新鮮糞便檢體加入 Tetrathionate Broth 進行增菌，以無菌操作鈎菌培養在 CHROMagar™ Salmonella，經 37°C 24 小時，選擇紫

色菌落純化，再用 API-20E 快速鑑定套組鑑定，確認後將沙氏桿菌保存在含 10% 甘油的 Tryptic soy broth，置於 -70°C 冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

產氣莢膜梭菌培養：將上述新鮮糞便檢體，以無菌操作釣菌培養在血液培養基後，置於 37°C 厭氧培養 24-48 小時，選擇圓形、直徑約 1-2 mm、呈溶血狀態之菌落。再做確定試驗如運動性、硝酸鹽還原、乳糖發酵、明膠液化、產芽孢、碳水化合物發酵等試驗，確認後將產氣莢膜梭菌保存在含 10% 甘油的 Tryptic soy broth，置於 -70°C 冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

李斯特菌培養：將上述新鮮糞便檢體，先以費氏培養液中，置於 30°C 培養 24 小時，當有李斯特菌存在時，費氏培養液因粟糖苷的利用而產生黑變。沾少許的菌液塗抹於 CHROMagar™ Listeria 培養基，再以接種環進行四區劃線，置於 37°C 培養 24 小時，典型李斯特菌的菌落即呈現藍色白環區，再分別接種於 BHI agar、BHI broth 及斜面營養培養基，置於 18-25°C，16-18 小時培養，以備進行各生化特性測試用。確定試驗有傘狀運動、CAMP、觸酶、氧化酶、MR-VP 等等試驗。確認後將李斯特菌保存在含 10% 甘油的 MOX broth，置於 -70°C 冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

彎曲桿菌的培養：將上述新鮮糞便檢體，取接種環的菌量置於 CHROMagar™ campylobacter 培養基上，再劃線分離，於 42°C 微好氧培養 24-48 小時，每隔 24 小時觀察是否有菌落生長，選擇呈圓形至不規則狀，具有平滑的邊緣，呈紅色菌落。再進行各生化特性測試(馬尿酸鹽水解、乙酸引朵酯水解、葡萄糖利用、TSI、抗生素抑制等等試驗)。確認後將彎曲

桿菌保存在含 10% 甘油的 BHI broth，置於 -70°C 冰箱中或以冷凍乾燥法保存。

#### 4. 病原核酸的抽取和純化

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

#### 5. 病原特異性引子對的設計

針對不同病原已發表的引子對，來進行 PCR 和 RT-PCR。

輪狀病毒引子對：針對 VP6 gene 的片段序列

VP6F: 5'-GACGGVGCRACTACATGGT-3';

VP6R: 5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG-3' (19)。

VP6 全長引子對：JRG7: 5'-GGCTTTAAAACGAAGTCTTC-3'

JRG8: 5'-GGTCACATCCTCTCACTACAT-3' (22)。

諾羅病毒引子對：

目前常見設計的區域有兩個：一是針對 open reading frame 1 (ORF 1) 的 polymerase gene 的保守區域所設計，主要由於 Polymerase gene 在所有物種中，均為病毒進行複製所必要的基因，故較少產生變異。二是針對 open

reading frame 1 (ORF 1)的 polymerase gene 的 3' end 和 5' end 的 open reading frame 2 (ORF 2)的 capsid gene 間的交界處所設計，由於諾羅病毒的全長病毒基因被解開之後，經過將不同物種間的全長病毒基因進行序列排列之後發現，相較於 polymerase gene 的保守區域，此交界處的基因序列更為保守。

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

本實驗室檢測 GII 的序列為 G2SKF:5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3';  
G2SKR:5'-CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT-3' (20)。

GIII 的序列為 CBECU-F:5'-AGTTAYTTTTCTTYTAYGGGA-3';  
CBECU-R:5'-GAAAAATCTGGAAAGCCAA-3' (30)。

沙氏桿菌引子對：針對 16-23S rRNA gene 的序列為  
ITSF 5'-TGCGGCTCACCTCCTT-3';  
ITSR 5'-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC-3'(6).

彎曲桿菌引子對：針對 23S rRNA gene 的序列為  
THERM1 5'-ATTCCAATACCAACATTAGT-3';  
THERM4 5'-CTTCGCTAATGCTAACCC-3' (8)。

李斯特菌引子對：針對 hlyA gene 的序列為

GO 5'-GAATGTAACTTCGGCGCAATCAG-3';

DO 5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3' (3)。

梭菌引子對：Clostridium difficile:針對 toxin B gene 的序列為 NK104:

5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC-3';

NK105: 5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3' (2)。

Clostridium perfringens:針對 Consensus cpb2 gene 的序列為

Cpbeta2F: 5'-CAAGCAATTGGGGGAGTTTA-3';

Cpbeta2R: 5'-GCAGAATCAG GATTTTGACCA-3' (35)。

## 6. 聚合酶連鎖反應 (PCR)

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

## 7. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

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

## 8. PCR 產物之選殖和定序

將 PCR 的產物利用 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) 純化後，再放

至 pCR2.1-TOPO(T/A) or PCR XL cloning kit (Invitrogen)，所得到的 clone 隨機選取 5 個，利用 BigDye Terminator Cycle and 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)的方法讀取基因序列。

#### 9.Internal Control RNA

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

10.細菌之脈衝式膠體電泳(PFGE)分析：將純化培養好的菌株及分析用標準 marker 菌株 H9812 以無菌棉棒刮取菌落至裝有 2 mL Cell Suspension Buffer 之 13 × 100 mm KIMBLE culture tube 中，混合均勻後以 MicroScan TurbidityMeter 濁度計調整濁度值至 0.68-0.72。先加入 20 μL 之 20 mg/mL Proteinase K 溶液至微量離心管中，再取出測好濁度之菌液 400 μL 放入微量離心管中緩慢混合均勻。將上述裝有 400 μL 菌液之 1.5 mL 微量離心管，再加入 400 μL 包埋用瓊脂（1% SeaKem Gold agarose）混合均勻後，快速注滿鑄膠模具，待其冷卻固化形成膠塊。配置 Proteinase K/Cell Lysis Buffer



每隻試管含 20 mg/mL Proteinase K 25  $\mu$ L + Cell Lysis Buffer 5mL)，推入固化之膠塊，置於 56 °C 恆溫震盪水浴槽中 shaking wash 1.5~2 小時。取出膠塊以二次水於 56 °C 清洗兩次，每次 15 分鐘；再以 TE buffer 於 56 °C 清洗四次，每次 15 分鐘。清洗完之膠塊切出一寬 2 mm  $\times$  長 10 mm 之細長狀膠條，置入限制酵素專用緩衝溶液中，於室溫下 5~10 分鐘。移除上述緩衝溶液，取出膠塊及 PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812，置入 200  $\mu$ L 加入已含有酵素 Xba I (10 Units) 限制酵素專用緩衝溶液，放置 37 °C 乾浴器或水浴槽 1.5~2 小時。配製 1% 電泳膠片，將經過限制酶切割的膠條平貼於尺梳上，將 PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812 放置在第 1、5、10、15 孔，其餘位置放置樣品菌株，倒入 56°C 的 1% Seakem Gold agarose 電泳用膠，放置室溫 30-60 分鐘，待冷卻凝固後即可進行電泳。電泳膠片以電泳槽 CHEF-DRIII (Bio-Rad Lab.) 進行電泳，電場變換時間從 2.16 秒到 63.8 秒 (最初至最終變換時間)，電場強度為 6 volt/cm，角度 120°，溫度控制於 14°C，電泳時間為 19 小時。電泳膠片放置於 20  $\mu$ L /mL ethidium bromide 染色 3 分鐘，並且以 2 次水退染 10 分鐘。膠片放置於 UV 平台上觀察，並以數位影像處理系統擷取 DNA 圖譜影像檔儲存成數位檔案 (tif 檔)，供後續 Bionumerics 電腦軟體進行圖譜分析比對，由 XbaI 實驗之 PFGE 其通常以 UPGMA 規則產生預期兩基因片段之間類似性 (陽性差異性 0.9%；理想值為 1%)。

11. 細菌之基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI -TOF) 分析：取新鮮之菌落溶於 300  $\mu$ L 無菌純水中，並於純水中將菌塊打散，再加入 900  $\mu$ L

無水酒精，離心 13000 rpm，2 分鐘，移除上清液，倒置於無菌操作檯風乾。樣品風乾後加入蟻酸及 ACN 溶液，將菌塊打散，離心 13000 rpm，2 分鐘。將前處理完的菌液，以微量吸管取 2 $\mu$ L 加入樣品盤上，再加入 1  $\mu$ L HCCA 基質溶液。將樣品盤放置於無菌操作檯進行風乾。之後將風乾後的樣品盤，置於 MALDI -TOF 質譜儀進行分析與菌種鑑定。

## 12. 資料分析方法

將上述得到的病原基因序列，先以 Lasergene software package (v5, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 的方法進行處理，再以 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 的方法，找到相似的病原基因序列後，將所有的序列利用 Clustal W (v1.83) 在日本的 DNA Data bank 上進行排序之後，再進行演化樹的分析。菌株或剩餘檢體將提供給疾管署進行確認分析，並提供定序相關資料進行人或畜牧場周邊水源環境調查比對。

## 參、結果

1. 豬隻糞便食媒性病原檢測結果：將採集豬糞便攜回實驗室進行上述食媒性病原之檢測。細菌檢測方面：將分離細菌純化和鑑定，之後以聚合酶連鎖反應再確認細菌。病毒檢測方面：從糞便上清液用 QIAGEN viral RNA Mini kit 抽取 RNA，RT-PCR 反應。2014-2017 年 10 月病原場陽性率，輪狀病毒各年度發生率分別為 72.9%(35/48)、33.3%(12/36)、16.6%(6/36)、8.3%(3/36)。諾羅病毒各年度分別為 14.5%(7/48)、2.7%(1/36)、2.7%(1/36)、0%(0/36)。沙氏桿菌各年度

分別為 18.7%(9/48)、19.4%(7/36)、16.6%(6/36)、11.1%(4/36)。Cl. Perfringens 各年度分別為 4.1%(2/48)、19.4%(7/36)、91.6%(33/36)、58.3%(21/36)。Cl. difficile 各年度分別為 0%(0/48)、2.7%(1/36)、22.2%(8/36)、22.2%(8/36)。彎曲桿菌各年度分別為 2.0%(1/48)、2.7%(1/36)、0%(0/36)、13.8%(5/36)。李斯特菌 2014-2017 年 10 月場陽性率皆為 0%。詳如圖一至圖七所示。

為瞭解不同年齡層豬隻糞便檢測食媒性病原之差異性，發現輪狀病毒主要發生在仔豬，其總陽性頭數和場數分別為 134 頭和 50 場，諾羅病毒在肥育豬，其總陽性頭數和場數分別為 10 頭和 6 場，沙氏桿菌在種豬，其總陽性頭數和場數分別為 16 頭和 13 場，產氣莢膜梭菌在種豬，其總陽性頭數和場數分別為 259 頭和 55 場，困難梭菌在仔豬，其總陽性頭數和場數分別為 32 頭和 16 場，彎曲桿菌在仔豬，其總陽性頭數和場數分別為 4 頭和 4 場，李斯特菌則無檢測到陽性豬隻。詳如表一和表二所示。

2.依不同季節檢測豬隻糞便食媒性病原結果：為瞭解不同季節對上述食媒性病原的感染情形是否有影響，一般分春季(1-3 月)，夏季(4-6 月)，秋季(7-9 月)，冬季(10-12 月)，其結果從 2014 年至 2017 年 10 月，輪狀病毒於 2014 年春季佔 50%、夏季佔 83.3%、秋季佔 75%、冬季佔 83.3%；2015 年春季佔 66.6%、夏季佔 33.3%、秋季與冬季皆為 22.2%；2016 年春季佔 22.2%、夏季佔 11.1%、秋季佔 22.2%、冬季佔 11.1%；2017 年春季佔 22.2%、夏季佔 11.1%、秋季與冬季皆為 0%。諾羅病毒 2014 年春季佔 16.6%、夏季佔 0%、秋季佔 33.3%、冬季佔 8.33%；2015 年春季佔 11.1%、夏季、秋季及冬季皆為 0%；2016 年春

季佔 0%、夏季佔 11.1%、秋季佔 0%、冬季佔 11.1%；2017 年四季皆為 0%。沙氏桿菌 2014 年春季佔 25%、夏季佔 0%、秋季佔 8.33%、冬季佔 33.3%；2015 年春季佔 33.3%、夏季佔 11.1%、秋季佔 22.2%、冬季佔 11.1%；2016 年春季佔 0%、夏季佔 33.3%、秋季佔 22.2%、冬季佔 11.1%；2017 年春季佔 0%、夏季佔 33.3%、秋季佔 22.2%、冬季佔 0%。Cl. Perfringens 2014 年春季及夏季皆為 0%、秋季佔 16.6%、冬季佔 8.33%；2015 年春季佔 11.1%、夏季及秋季皆為 0%、冬季佔 66.6%；2016 年春季、夏季及秋季皆為 100%、冬季佔 66.6%；2017 年春季佔 88.8%、夏季及秋季皆為 55.5%、冬季佔 0%。Cl. difficile 2014 年四季皆為 0%；2015 年春季、夏季及秋季皆為 0%、冬季佔 11.1%；2016 年春季佔 0%、夏季佔 55.5%、秋季佔 33.3%、冬季佔 0%；2017 年春季佔 11.1%、夏季佔 55.5%、秋季佔 22.2%、冬季佔 0%。彎曲桿菌 2014 年秋季佔 8.33%，春季、夏季及冬季皆為 0%；2015 年夏季佔 11.1%，夏季、秋季及冬季皆為 0%。2016 年四季皆為 0%。2017 年春季、夏季、秋季皆為 22.2%、冬季為 0%。李斯特菌 2014 年至 2017 年 10 月，四年皆為 0%。詳如圖八至圖十四所示。

3.分析豬場豬隻食媒性病原之危險因子結果：為瞭解豬場豬隻食媒性病原之危險因，以問卷調查方式進行（附錄一），再採樣過程中，向養豬場負責人以問答方式記錄問卷內容資料再分析其危險因子，結果從問卷調查資料中尚難確定，推測可能原因是採集的豬是健康狀態，沒有腹瀉症狀與採樣頭數和場次較少，另飼料中有添加抗生素和酵素與病原檢測率較少有關。

4. 分析廢水處理之豬隻糞便食媒性病原檢測結果：為瞭解陽豬場豬隻食媒性病原經廢水處理系統後，其放流水是否尚有上述食媒性病原之存在，以便評估放流水再利用之效益，結果大部分的病原被消滅未檢測出，除產氣莢膜梭菌部分陽性豬場尚有存在，需再進一步分析其產氣莢膜梭菌是否具有分泌毒素基因，以提供養豬產業放流水再利用參考的依據。

5. 分析陽性檢體之基因親緣關係：輪狀病毒方面發現在本省豬群的相似度為 86.9 – 91.4%，而與人的相似度為 76.7 – 91.8%，詳見圖十五至圖十六所示。而今年檢測之輪狀病毒 VP6 基因進行基因序列比對，並分析其親緣關係。在豬隻輪狀病毒發現有三個族群，一群與泰國株相近，相似度達 91.3%，第二群與越南株相近，相似度達 90.6-92.7%。第三群與中國株相近，相似度達 91.8-91.9%。詳見圖十七至圖十八所示。以 VP6 基因與疾管署資料庫的台灣豬隻及人類進行親緣關係之比對，分離出的陽性檢體與疾管署資料庫中的豬及人類，縣市分布區域相近，圖十九所示。以 G9 及 P19 基因與疾管署資料庫中的台灣豬隻及人類進行親緣關係之比對，孩童和豬的縣市分布區域相近，詳見圖二十至圖二十一所示。而沙氏桿菌以脈衝式膠體電泳分析，發現只有一種血清型為 *Salmonella typhimurium* 且具有多重抗藥性。詳見圖二十二所示。產氣莢膜梭菌陽性率高，顯示本菌是汙染豬場的常在菌。彎曲桿菌檢測率也低。其血清型可進一步再分析，然李斯特菌尚無檢測出陽性。顯示此菌在豬隻是偶見之細菌。

6.分析豬場豬隻食媒性病原之傳播情形結果：為瞭解豬場豬隻食媒性病原之危險因，以問卷調查方式進行(附錄一)，結果從問卷調查資料中亦難找出其原因，一般病原之傳播均由外面傳入(如藉由車輛運輸、人員衛生、飼料、候鳥等等)(附錄二)。但據國內外文獻，有關小孩感染沙氏桿菌的危險性因子的報告中，顯示小孩有接觸到患有下痢的病患(48, 49, 50)、則會增加沙氏桿菌感染的風險，故人傳人是沙氏桿菌重要的傳染途徑，而接觸動物(51, 52, 53)，亦會增加沙氏桿菌感染的風險，但從本計畫問卷調查中無此危險因子的選項，只調查工作人員是否有下痢、飲用水的來源和豬場環境衛生及交通運輸車輛消毒清潔的時間和次數，但從結果資料顯示無法證明其傳染途徑。需再進一步的調查研究，以確定其可能傳播途徑。

## 肆、討論

### 一、分析本省養豬場在食媒性病原常見的種類

許多高危險性致病原藉由各種不同的食物為媒介造成人類的疾病，全世界每年藉由食物媒介引起的疾病，估計每年約有 6 千 8 百萬至 2 億 7 千 5 百萬人發生，嚴重的病例需住院治療，甚至造成死亡，嚴重的影響經濟損失頗巨(16,23)。目前已知食媒性病原有 31 種之多，包括細菌、病毒、寄生蟲等等，其中最重要的是引起人類的食物中毒外，亦造成感染動物的疾病，而感染動物的種類範圍廣泛，在這些致病性病原中，常與國人健康習習相關。從本次計畫的檢測中發現病原比例在豬隻方面依序是產氣莢膜梭菌、困難梭菌、沙氏桿菌、彎曲桿

菌、輪狀病毒。過去本省對豬隻糞便中引起人畜共通傳染病的非通報疾病的研究甚少，只有少數如沙氏桿菌和大腸桿菌的感染有報告，也著重於血清型別和抗藥性的分析，而無全省性的流行病學調查，故無法做進一步的比較分析其陽性率及感染途徑，但從本計畫的結果得知有 6 種食媒性病原的檢出，在場陽性率與國外報告比較，輪狀病毒較高，而諾羅病毒較低(38, 39,40)，而頭數陽性率與國外報告比較則較低 (41,42,43)，推測其原因可能是歐美國家對抗生素的使用，規定嚴謹，尤其歐盟規定經濟動物飼料中禁止添加抗生素，而本省養豬場飼料中添加益生菌和酵素的比例很高以及國外文獻報告進行病原檢測大都以下痢糞便做檢體，所以國外報告其病原菌陽性率較高。至於飼料中添加益生菌可降低病原菌的感染，已有文獻報告(44,45,46,47)，所以病原檢出陽性率有逐年下降的趨勢。可見本省豬隻糞便中含有食媒性病原的存在，值得重視並請養豬場工作人員務必小心，重視環境的清潔、衛生和消毒工作，減少被感染的危險性。

## 二、養豬場環境的監測：

食媒性病原無所不在，尤其是養豬場周邊的環境，因為這些病原可藉由各種管道傳染給豬隻，有些病原感染不同年齡的豬隻後，其臨床症狀不一，有從不顯性到急性的臨床症狀，最可怕的是不顯性感染，又持續的排出病原造成污染周遭的環境，使病原永遠存在養豬場，並使易感性的動物感染發病。在本次計畫中發現不同年齡豬隻檢測結果有輪狀病毒、困難梭菌在哺乳豬發生率最高，此結果和國內外論文發現的現況相似(1,5,18,23,27)。而產氣莢膜梭菌和沙氏桿

菌在種母豬發生率高，此結果顯示這兩種病原會持續污染養豬場，造成感染其它年齡豬隻，這也是養豬場最感頭痛的問題之一，因種母豬在養豬場飼養時間很長，一旦種母豬檢測有這兩種病原，最好防治的方法即先隔離治療，豬場再做徹底的消毒工作，如無法根除則將陽性種母豬淘汰，以絕後患。至於養豬場環境的監測也要重視飼料、飲水、野生動物如犬和貓及運豬車輛的檢測和消毒工作，因有些病原如沙氏桿菌、彎曲桿菌、梭狀桿菌和李斯特菌會藉由污染飼料和飲水感染豬隻，也是最常見的途徑之一，此結果和國內外論文發現的現況相似(6,12,16,17,22)。

### 三、分析本省養豬場在食媒性病原危險因子的分析：

為瞭解動物感染食媒性病原的情形，今年選定本省經濟動物與國人有密切關係的豬隻對上述病原的陽性率調查，在食物中毒的感染過程中，過去的文獻報告中有發現，在致病原造成人類感染前，經由環境或動物宿主再以不同的傳播途徑給人類。本計畫將探討與國人健康有密切關係的豬隻危險因子(包括病原種類、地區環境、季節和年齡)，分析這些危險因子與疫情流行的概況是否相關性，從本計畫的結果顯示，檢測7種本省常見的食媒性病原中，截至目前共檢測出6種食媒性病原(即輪狀病毒、產氣莢膜梭菌、困難梭菌、沙氏桿菌、諾羅病毒、彎曲桿菌)、李斯特菌則未檢測出陽性檢體。依地區環境四個行政區域都有檢測出陽性檢體在豬隻方面只有輪狀病毒。依不同季節(春、夏、秋、冬)都有檢測出陽性檢體在豬隻方面只有產氣莢膜梭菌。目前的資料分析，亦



可提供農政單位對疾病防控參考的依據。檢驗結果呈陽性豬場，與疾管署主辦人員聯繫，將陽性檢體送回CDC以供基因比對，探討人畜共通傳染病之親緣關係。

#### 四、分析本省養豬場在食媒性病原之基因型和親緣關係：

本計畫檢測豬隻陽性之輪狀病毒進行基因型別鑑定發現共 17 種，在豬群中常見型別有 8 種，即 G3P13, G3P19, G9P13, G5P13, G9P19, G4P6 和 G9P23，非常見型別有 9 種，即 G9P6, G4P19, G5P23, G4P23, G5P19, G26P?, G26P19, G5P? 和 G3P?，其中有 3 株的 P 基因尚未檢出(48)，顯見其基因型別多樣化，其中一株與本省從人類分離之病毒株非常接近，這意味著在本省豬隻因為對輪狀病毒未採取防疫措施，病毒之間可能會再進行基因重組形成新的病毒株，再危害豬隻或人類。未來尚需進行進一步的研究。而分離之沙氏桿菌血清型經 PFGE 鑑定只有一種即 *Salmonella typhimurium*，此血清型豬隻是帶菌者(49)，雖然對豬隻致病性低，但對人類感染會引起嚴重的腹瀉，影響健康，且發現具多重抗藥性，需注意避免此菌的汙染。

#### 伍、結論與建議

1. 至目前檢測 960 隻糞便和 72 件廢水對上述食媒性病原菌檢測出有 5 種病原菌，即輪狀病毒、沙氏桿菌、彎曲桿菌、產氣莢膜梭菌和困難梭菌，而李斯特菌及諾羅病毒未被檢測出。
2. 檢測有陽性的食媒性病原菌中，在豬隻方面以產氣莢膜梭菌檢出率(63 件)最

- 高、依序是困難梭菌(9 件)、沙氏桿菌(5 件)、彎曲桿菌(5 件)、輪狀病毒(3 件)。
- 顯示豬隻糞便中有食媒性病原菌的存在，相關防疫單位須注意。
- 3.本次對產氣莢膜梭菌在豬隻和各年齡層及全省各地區均有檢測出，意為著此菌是普遍有存在，但因未檢測是否有分泌毒素，建議明年度計畫能檢測其毒素基因，以釐清此菌的重要性。
- 4.所分離之 Rotavirus 陽性檢體，進行 VP6 基因序列分析，與本省小孩發生的 Rotavirus 其親緣關係甚近，未來是否用衛星定位方式，追蹤其相關性。
- 5.所檢測的食媒性病原在我國豬隻疾病中，大部分是非法定傳染病，如有發生不需通報防檢局報備，較易被部分養豬場主人接受採集檢測。
- 6.採集檢體前，均向養豬場主人說明採集檢測的目的和檢測項目，如檢測有陽性例，會以電話聯絡，並告知如何防治(如消毒槽需每日更換一次、畜牧場應定期消毒，每週進行徹底之消毒、工作人員進入畜牧場前應洗手、更衣、換鞋)。此項計畫建議分年持續進行檢測，其結果更能讓養殖戶對所飼養的動物健康更具信心，讓國人對人畜共通傳染病的重要性更進一步的了解。
- 7.本計畫針對健康豬隻糞便檢測食媒性病原結果發現，輪狀病毒、困難梭菌和彎曲桿菌主要發生在仔豬，諾羅病毒主要發生在肥育豬，沙氏桿菌和產氣莢膜梭菌主要發生在種豬，且無明顯的季節流行趨勢。為減少這些病原存在豬場，下列建議事項提供政府訂定政策參考：
- A. 加強養豬場環境衛生的消毒與清潔，落實每週至少一次的消毒政策。
- B. 建議以『批次生產』或『統進統出』方式飼養豬隻，以杜絕病源之傳播。

- C. 建議實施檢測與淘汰政策。
- D. 加強對進口之原物料和飼料添加物的檢驗，防範病原之進入。
- E. 施打疫苗或飼料添加抗生物質。
- F. 舉辦講習會，宣導人畜共通疾病的重要性。
- G. 建議牧場動物病原的檢測由防檢局來執行。
- H. 建議計畫執行的經費請按計畫主持人編列經費核撥。

#### 陸、參考文獻

1. 劉振軒、潘銘正、蔡睦宗、龐飛、黃瑞禎、廖明一、許永祥。簡明人畜共通傳染病。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局/財團法人台大獸醫學系系友文教基金會編印。2004。
2. Barroso LA, Wang SZ, Phelps CJ, Johnson JL and Wilkins TD. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. *Nucleic Acids Res.* 1990.18:4004.
3. Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J and Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Research Microbiology.* 1992. 143:271-280.
4. Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kang JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen KT, Jiraphongsa C, Ponguswana Y, Nguyen VM, Phan VT, Le TL, Hummelman E, Gentsch JR and Glass R. First report from the Asian rotavirus surveillance network. *Emerg Infect Dis.* 2004. 10:988-995.
5. Cheetham S, Souza M, Meulia T, grimes S, Han MG and Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol.* 2006.

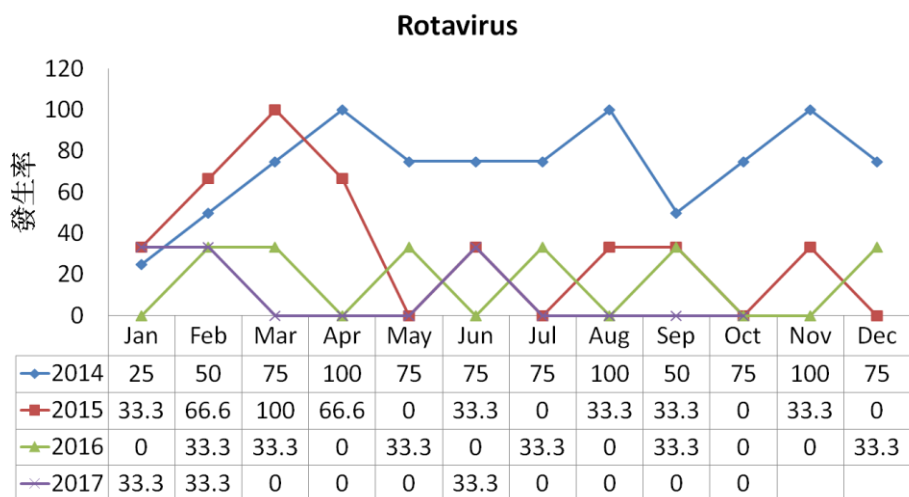
80:10372- 10381.

6. Chiu TS, Chen TR, Hwang WZ, and Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp in food. *J Microbiol.* 2005. 97:259-265.
7. Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, and Purcell RH. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are Equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(12):4576-4580.
8. Fermer CH, and Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacter, *Campylobacter* Jejuni, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol.* 1999. 37:3370-3373.
9. Fratamico PM, Sackitey SK, Widemann N and Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995. 21:2188-2191.
10. Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Eiwin K, Rooney PJ, Millar BC, Dooley JS, Lai AA and Xiao I, Three drinking-water associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis.* 2002. 8:631-633.
11. Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Trancillard P, Bost M, Gofti L, Zmirou D, and Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. 2000. 66(6):2690-2692.
12. Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P.582-608.
13. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, and Chavalitshewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *E.histolytica*, *E.dispar*, and *E. moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44:3196-3200.
14. <http://www.cdc.gov/mmwr>
15. <http://www.coa.gov.tw>
16. <http://www.cdc.gov.tw>
17. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, and Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic Characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J.Clin.Microbiol.* 2002. 40(4):1326-1332.
18. Hurtado AI, Aduriz G, Moreno B, Barandika J and Garcia-Perez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet Parasitol.* 2001. (1-2):17-27.

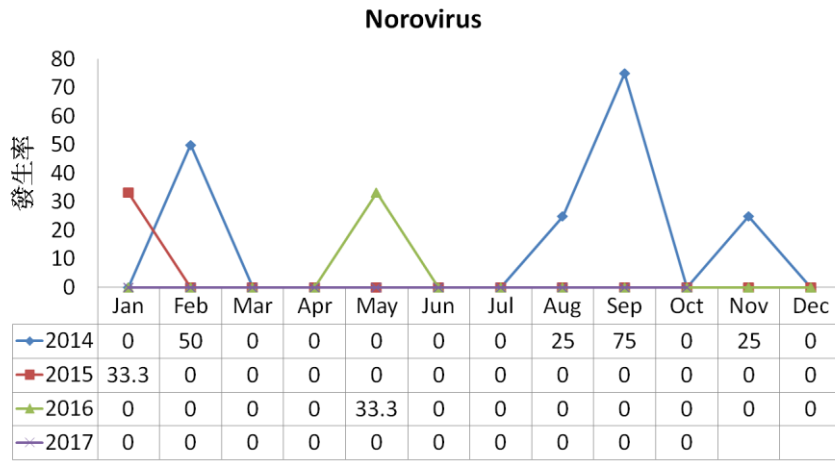
19. Iturriza Gomara MI, Wong C, Blome S, Desselberger U and Gray J. Rotavirus subgroup characterization by restriction endonuclease digestion of a cDNA fragment of the VP6 gene. *J Virol Methods*. 2002. 105:99-103.
20. Kojima SI, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N and Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol methods*. 2002. (1-2):107-114.
21. Krause DO and Hendrick S. *Zoonotic pathogens in the food chain*. CABI.2011.
22. Luan le T, Trang NV, Phuong NM, Nguyen HT, Ngo HT, Nguyen HT, Tran HB, Dang HN, Dang AD, Gentsch JR, Wang Y, Esona MD, Glass RI, Steele AD, Kilgore PE, Nguyen MV, Jiang B, Nguyen HD. Development and characterization of candidate rotavirus vaccine strains derived from children with diarrhoea in Vietnam. *Vaccine*. 2009.86:130-138.
23. Lee WC, Lee MJ and Kim JS. Food-borne illness outbreaks in Korea and Japan Studied retrospectively. *J Food Protect*. 2001. 64:899-902.
24. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML and Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>th</sup>. ASM press. 2007.
25. Naravaneni R, and Jamil K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of medical Microbiology*. 2005. 54:51-54.
26. Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW and Horng CB. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 1997. 35(5):1260-1262.
27. Parashar UD, hummelman EG, Bresee JS, Miller MA and Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003. 9:565-572.
28. Pass MA, Ordedra R, and Batt RM. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol*. 2000. 38:2001-2004.
29. Qu XX, Hao P, Song XJ, Jiang SM, Liu YX, Wang PG, Rao X, Song HD, Wang SY, Zuo Y, Zheng AH, Luo M, Wang HL, Deng F, Wang HZ, Hu ZH, Ding MX, Zhao GP and Deng HK. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(33):29588-29595.
30. Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H and Saif LJ. Reverse transcription- PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human valiciviruses. *J Clin Microbiol*. 2003. 41:3089-3099.
31. Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for salt red fruits. 2011. *Food microbiology*. 28:52-58.
32. Straw BE, Zimmerman JJ, Allaire AD and Taylor DJ. *Diseases of swine*. 9<sup>th</sup>. Blackwell publishing. 2006.

33. Su HP, Chiu SI, Tsai JL, Lee CL and Pan TM. Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995-2001. *J Infect Chemother.* 2005. 11:146-151.
34. Todd E. Preliminary estimates of costs of foodborne diseases in United States. *J. Food Prot.* 1989. 52:595-601.
35. van Asten Alpgons JAM, Allaart JG, Meeles AD, Gloudemans Peggy WJM, Houwers DJ and Grone A. A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all variants of the *Clostridium perfringens* cpb2 gene. *Veterinary Microbiology.* 2008. 127:412-416.
36. Ward RL, Jin Q, Nakagomi O, Sander DS, and Gentsch JR. Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotavirus in coinfecting cells. *Arch Virol.* 1996; 141(3-4):615-633.
37. Wim H.M. van der Poel, Jan Vinje, Reina van der Heide, Maria-Inmaculada Herrera, Amparo Vivo and marion P.G. Koopmans. Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals. *Emerging Infectious Diseases.* 2000; 6(1):36-41.
38. Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl DL, Friendship R, Rajic A, Houde A, and McEwen S. Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 2016; 80:95-105.
39. Amimo JO, Machuka EM, and Okoth E. First detection of rotavirus group C in asymptomatic pigs of smallholder farms in East Africa. *Pathogens.* 2017. 6:37-41.
40. Smitalova R, Rodak L, Smid B, and Psikal I. Detection of nongroup A rotavirus in fecal samples of pigs in the Czech Republic. *Vet. Med.* 2009. 54:12-18.
41. Amimo JO, Vlasova AN, and Saif LJ. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotavirus in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential of a potential new VP4 genotype. *Vet. Microbiol.* 2013. 164:27-38.
42. Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, Hotzel H, Machnowska P, Trojnar E, Hoffmann K, and Johne R. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 2015. 179:168-176.
43. Theuns S, Vyt P, Desmarets LM, Roukaerts ID, Heylen E, Zeller M, Matthijssens J, and Nauwynck HJ. Presence and characterization of pig group A and C rotavirus in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res.* 2016. 213:172-183.

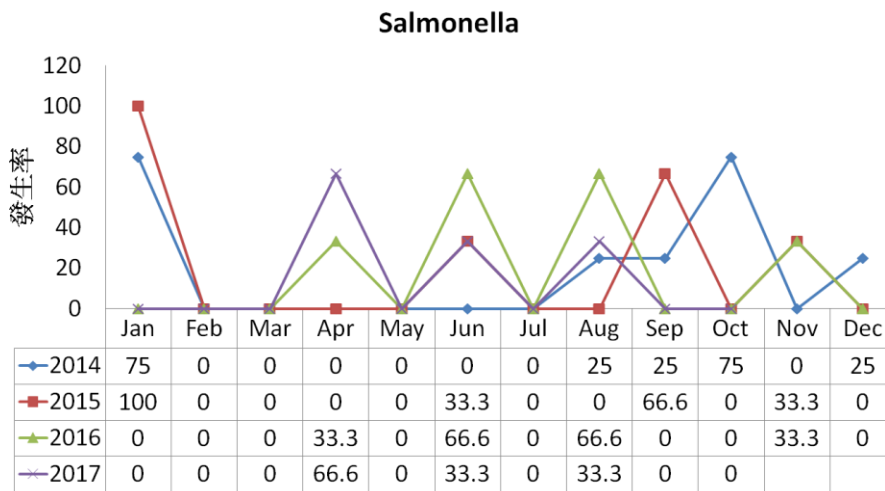
44. Emili BV, Lorena C, Paola LC, Montserrat RU, Jose A MM, and Susana M MO. Evaluation of the probiotic strain *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* CETC 7210 capacities to improve health status and fight digestive pathogens in a piglet model. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8:533(1-14)
45. Susanne K, Patrycja M, Jens A, Matthias S, Robert P, Michael FS, Gudrun AB, Lydia ST, and Reimar Johne. Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet. Research*. 2012, 43:58-69.
46. Paulo H.E. Arruda, Darin M. Madson, Alejandro Ramirez, Eric W. Rowe, and J. Glenn Songer. Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *Can Vet J*. 2016. 57:183-188.
47. Lei S, Ramesh A, Twitchell E, Wen K, Bul T, Weiss M, Yang X, Kocher J, Li G, Giri-Rachman E, Trang NV, Jiang X, Ryan EP, and Yuan L. High protective Efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7:1699.
48. Wu FT, Banyai K, Jiang BM, Liu LTC, Marton S, Huang YC, Huang LM, Liao MH, and Hsiung CA. Novel G9 rotavirus strains co-circulate in children and pigs, Taiwan. *Scientific Reports*. 2017. 7:40731.
49. Wood RL, and Rose R. Populations of *Salmonella typhimurium* in intestinal organs of experimentally infected carrier swine. *Am J Vet Res*. 1992. 53(5):653-658.



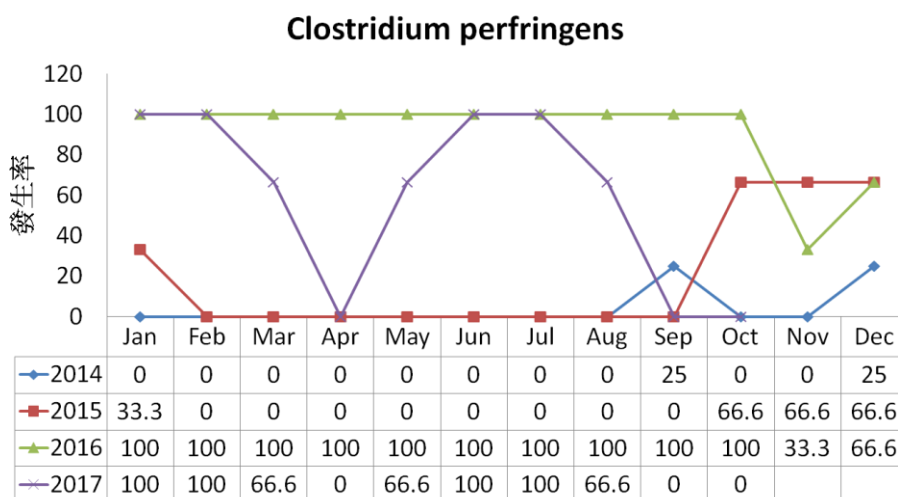
圖一、各年代輪狀病毒場陽性率



圖二、各年代諾羅病毒場陽性率

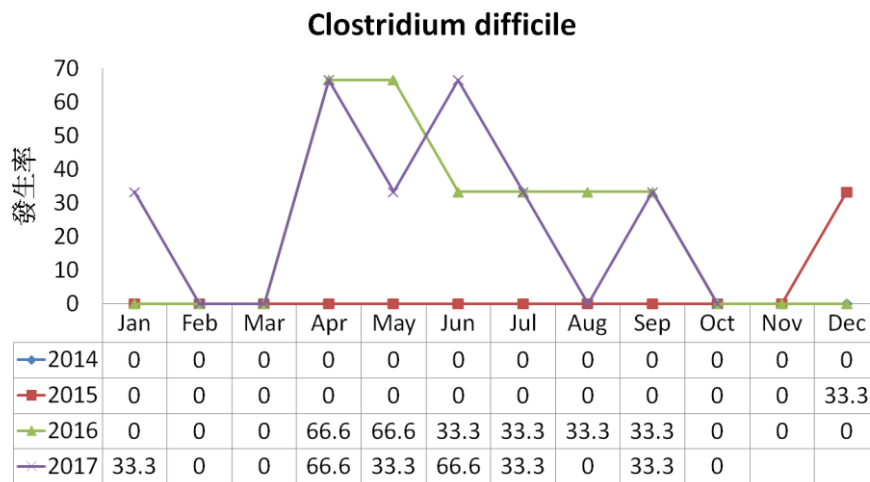


圖三、各年代沙氏桿菌場陽性率

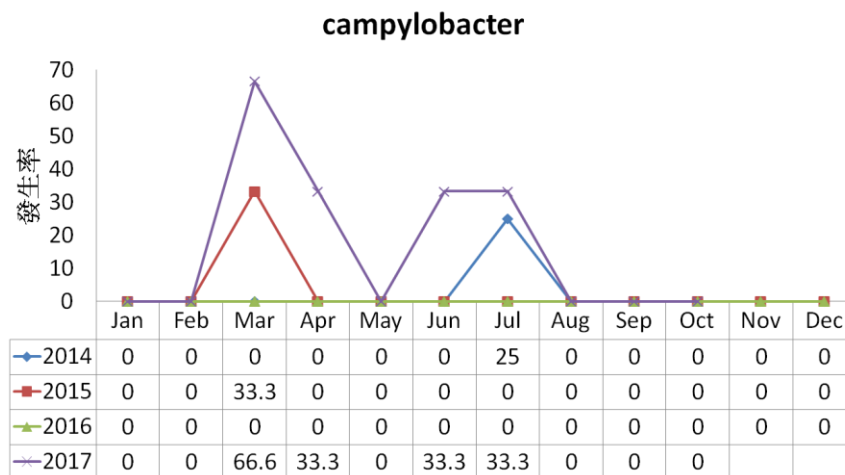


圖四、各年代產氣莢膜梭菌場陽性率

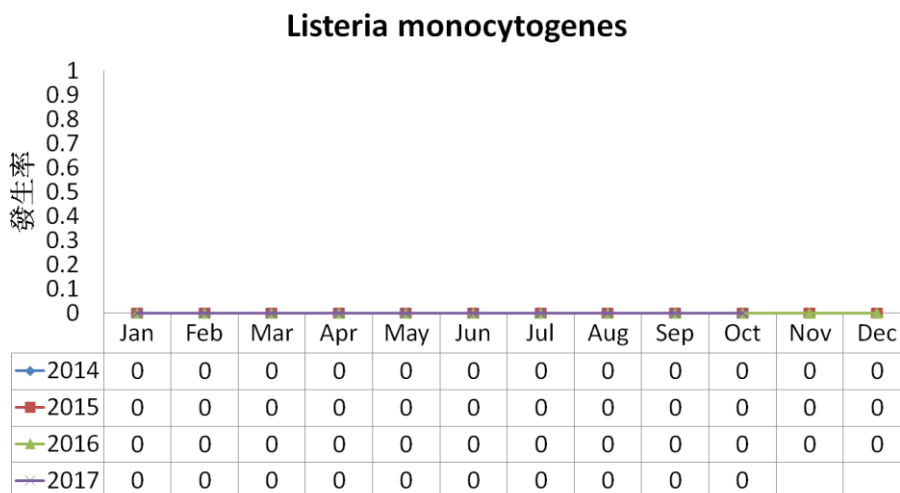




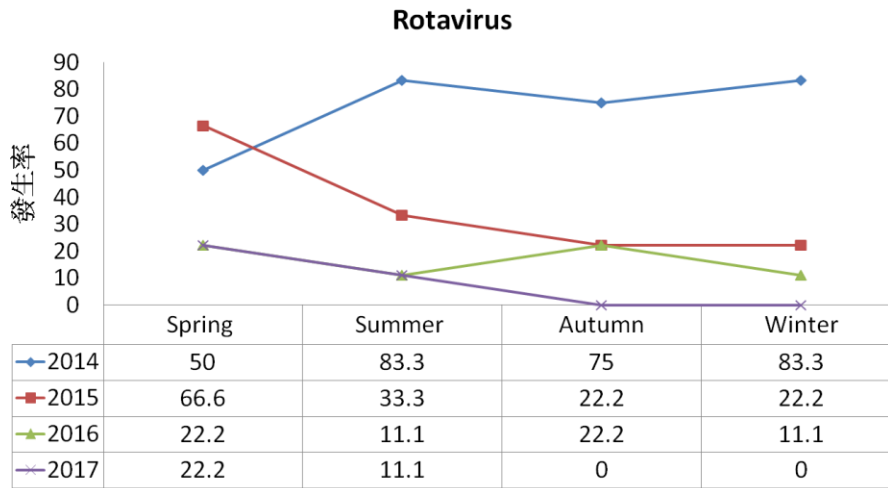
圖五、各年代困難梭菌場陽性率



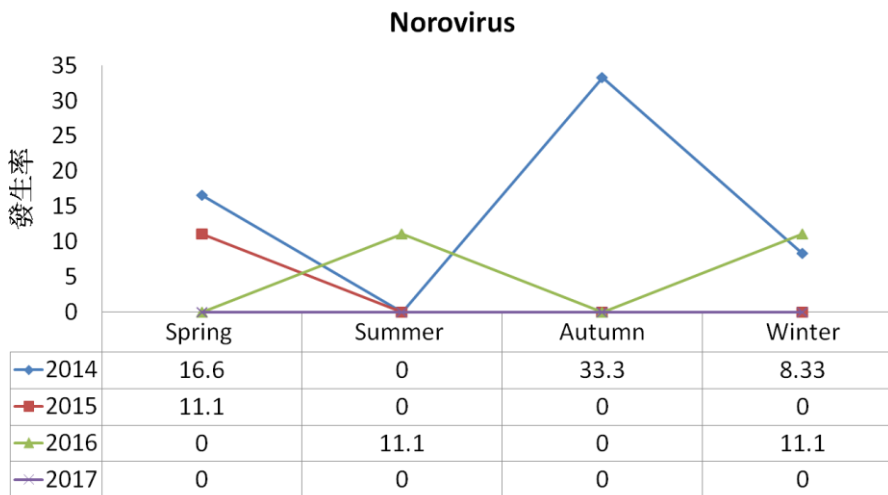
圖六、各年代彎曲桿菌場陽性率



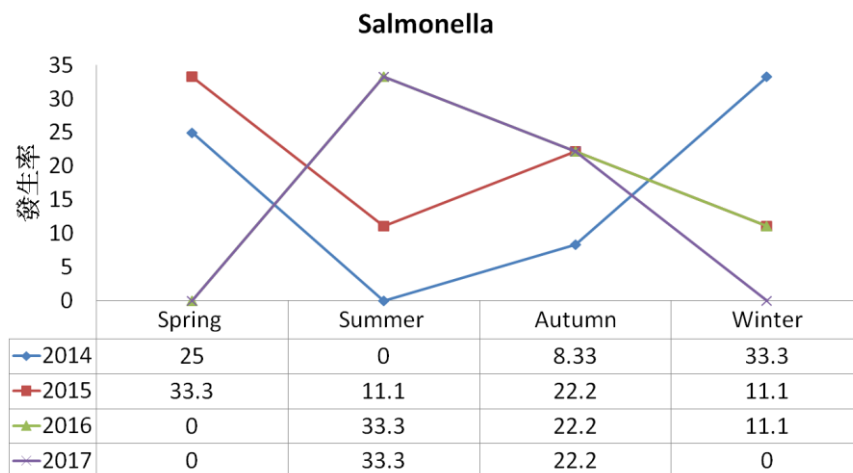
圖七、各年代李斯特菌場陽性率



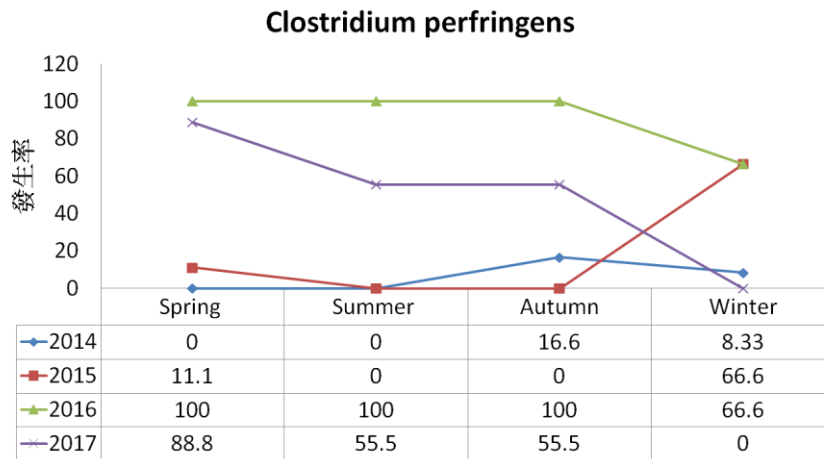
圖八、不同季節輪狀病毒陽性率



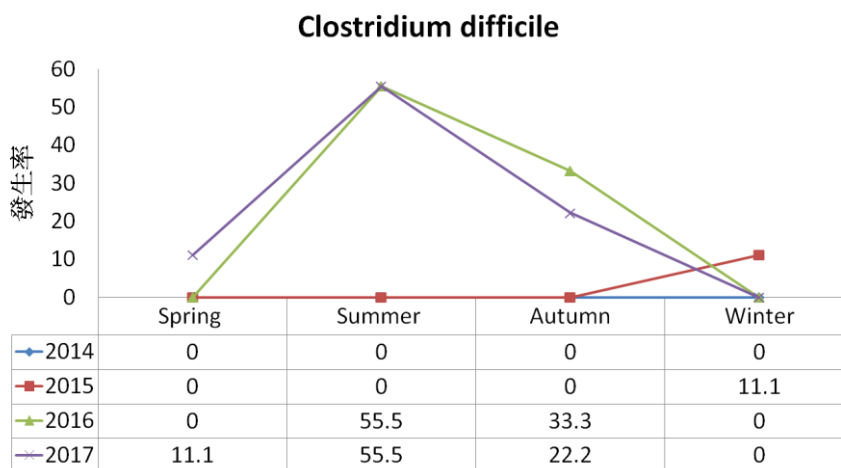
圖九、不同季節諾羅病毒陽性率



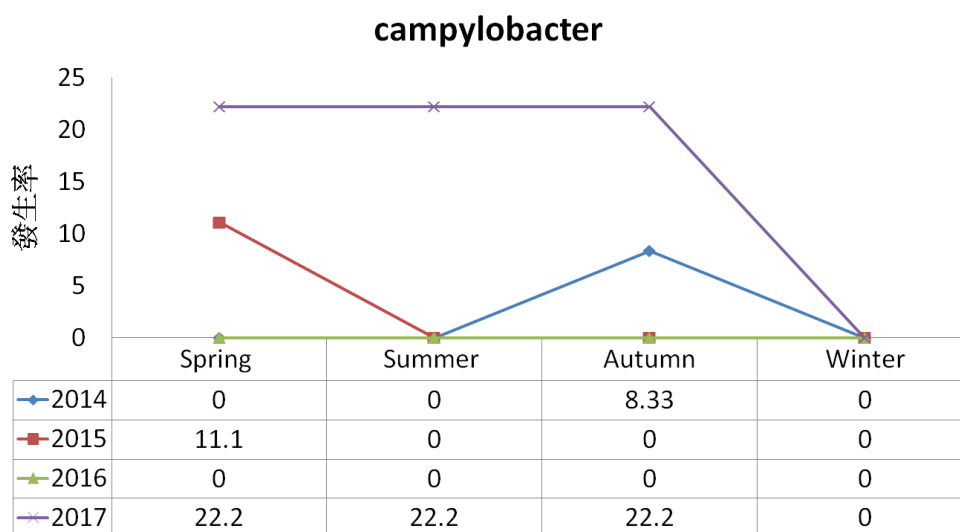
圖十、不同季節沙氏桿菌陽性率



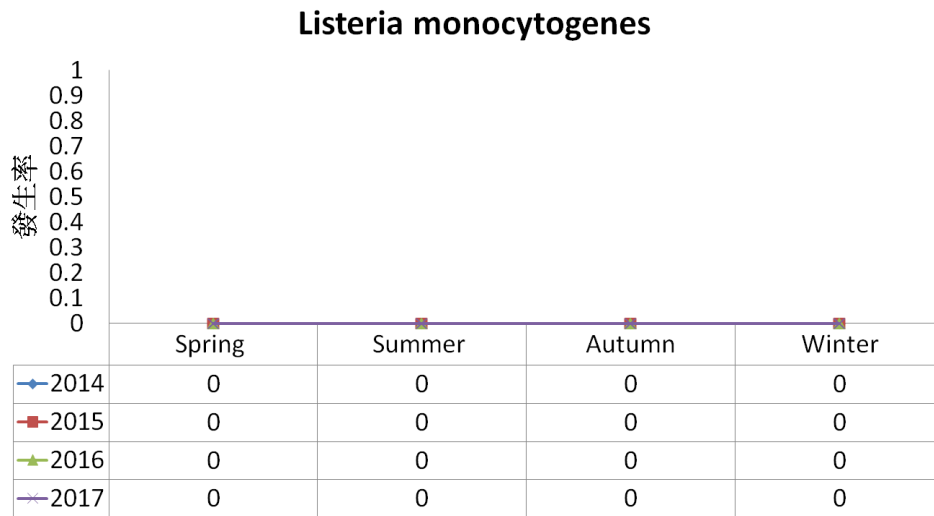
圖十一、不同季節產氣莢膜梭菌陽性率



圖十二、不同季節困難梭菌陽性率



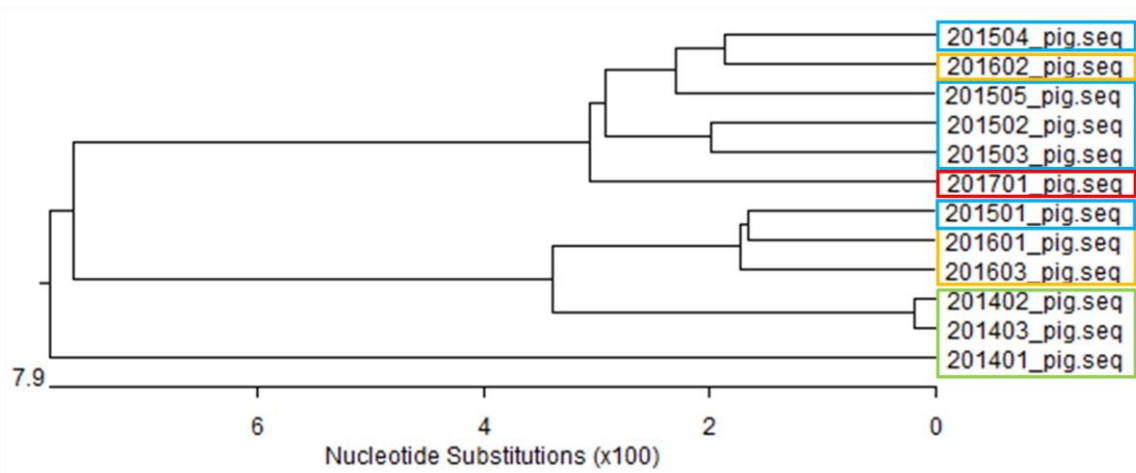
圖十三、不同季節彎曲桿菌陽性率



圖十四、不同季節李斯特菌陽性率

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence	1	■	84.4	84.3	84.1	88.1	87.4	86.7	87.2	83.7	87.3	84.6	88.5	1	201401_pig.seq
	2	17.8	■	99.6	93.6	87.2	86.2	85.7	85.3	94.2	85.9	93.4	87.6	2	201402_pig.seq
	3	17.9	0.4	■	93.6	87.3	86.2	85.7	85.3	94.1	85.9	93.4	87.6	3	201403_pig.seq
	4	18.2	6.8	6.8	■	86.1	85.4	85.2	84.1	96.8	85.2	96.9	86.5	4	201501_pig.seq
	5	13.2	14.2	14.1	15.7	■	96.2	93.7	95.1	86.1	95.1	86.4	95.2	5	201502_pig.seq
	6	14.2	15.5	15.4	16.5	4.0	■	93.4	94.3	85.8	94.7	86.3	94.5	6	201503_pig.seq
	7	15.2	16.1	16.1	16.8	6.7	7.1	■	95.4	83.4	96.4	85.4	93.3	7	201504_pig.seq
	8	14.5	16.5	16.5	18.2	5.1	6.0	4.8	■	82.5	95.8	84.8	93.5	8	201505_pig.seq
	9	18.7	6.1	6.2	3.3	15.7	16.0	19.2	20.4	■	84.0	96.4	86.0	9	201601_pig.seq
	10	14.4	15.8	15.8	16.7	5.1	5.5	3.7	4.4	18.4	■	85.7	93.9	10	201602_pig.seq
	11	17.5	7.0	7.1	3.2	15.2	15.3	16.5	17.2	3.7	16.0	■	86.6	11	201603_pig.seq
	12	12.8	13.7	13.7	15.1	5.0	5.8	7.2	6.9	15.7	6.4	14.9	■	12	201701_pig.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

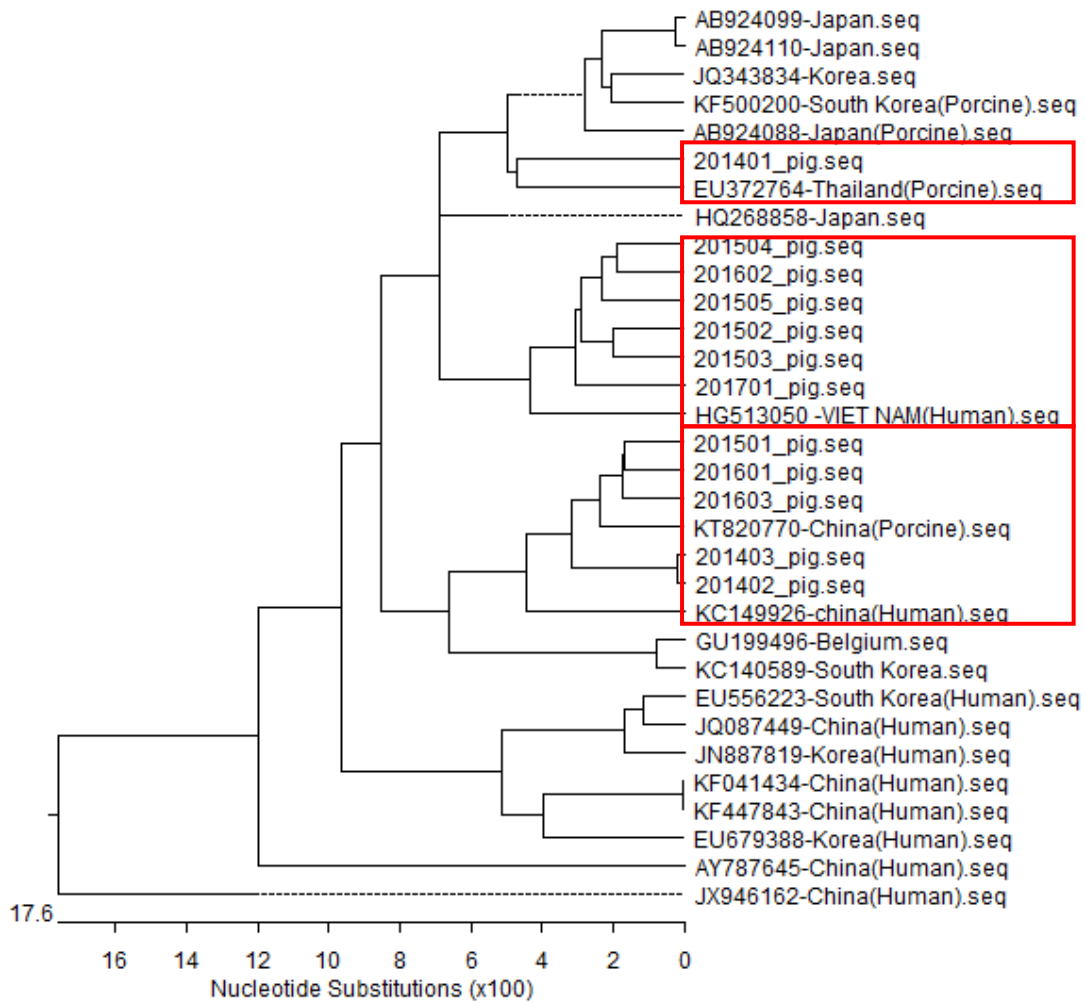
圖十五、豬隻輪狀病毒相似度及歧異度



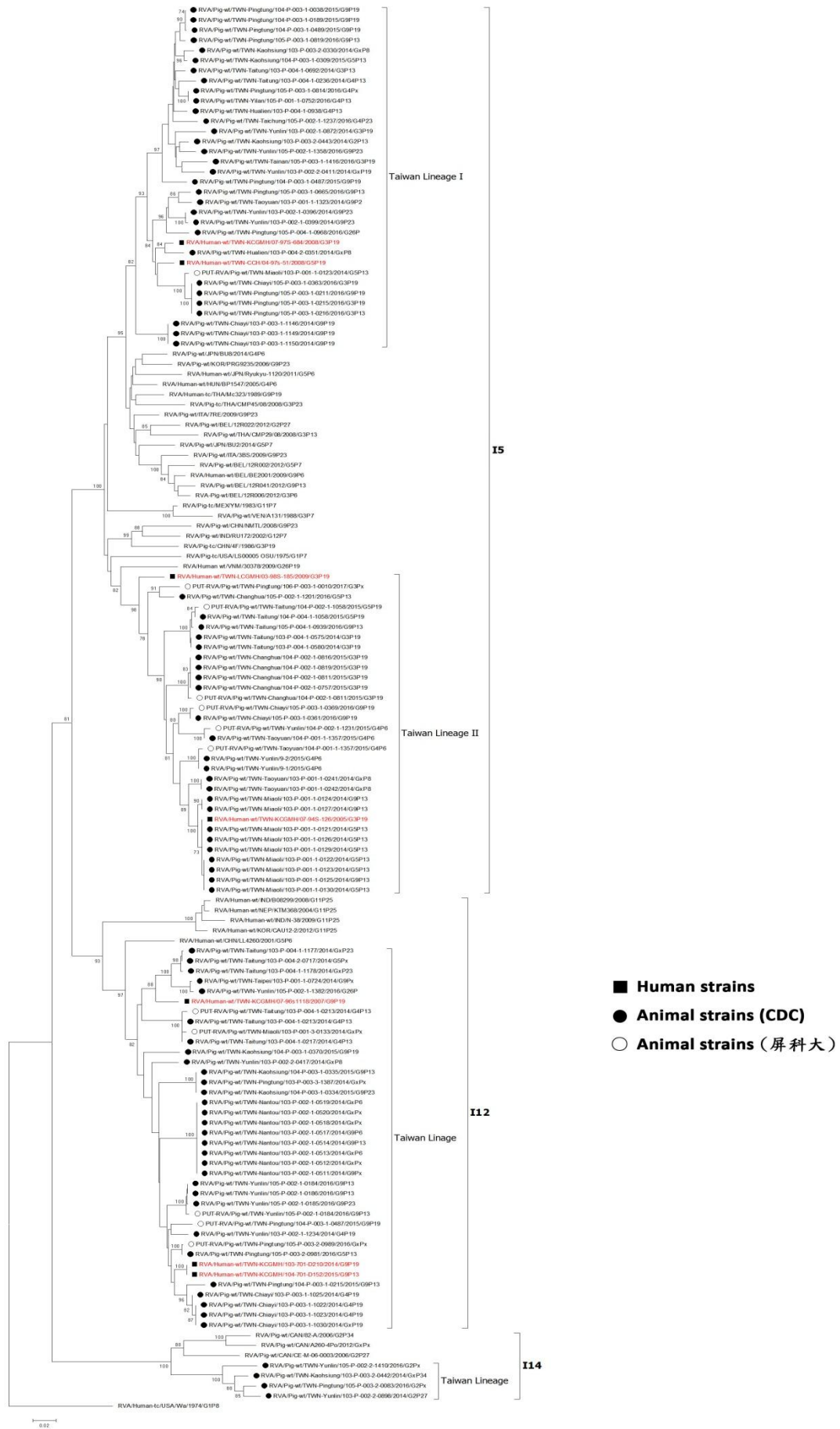
圖十六、豬隻輪狀病毒親緣關係

Percent identity																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	93.6	87.3	86.2	85.7	85.3	84.1	85.9	93.4	87.6	84.3	99.6	86.4	87.7	87.4	87.4	88.2	87.6	87.3	87.7	88.5	91.8	87.9	94.3	79.4	83.3	83.8	84.4	83.6	79.1	83.8	83.8	
2	6.8	88.1	85.4	85.2	84.1	96.8	85.2	96.9	88.5	84.1	93.6	87.4	87.4	87.2	86.9	86.7	86.8	87.2	87.4	86.8	91.9	87.9	95.2	78.8	84.0	83.3	84.5	84.0	79.4	83.7	83.7	
3	14.1	15.7	86.2	93.7	95.1	86.1	86.1	86.4	95.2	88.1	87.2	89.6	90.0	89.9	89.7	84.3	92.2	89.6	89.7	84.6	86.1	89.7	86.5	78.5	83.0	82.9	83.1	83.0	78.3	83.4	83.4	
4	15.4	16.5	4.0	93.4	94.3	85.8	94.7	86.3	94.5	87.4	86.2	86.9	89.8	89.7	90.0	83.6	91.6	89.2	89.7	84.0	85.4	89.4	86.3	77.1	82.5	82.6	82.7	82.4	76.6	83.1	83.1	
5	16.1	16.8	6.7	7.1	95.4	83.4	96.4	85.4	93.3	86.7	85.7	86.0	88.9	88.6	88.4	84.0	90.4	88.8	89.0	84.1	84.3	89.0	85.4	79.5	83.2	84.0	82.7	83.0	78.1	83.8	83.8	
6	16.5	16.2	5.1	6.0	4.8	82.5	95.8	84.8	93.5	87.2	85.3	86.0	88.7	88.6	88.7	84.2	90.6	88.8	89.2	84.3	84.6	88.3	85.1	79.0	82.3	83.0	81.8	81.9	77.6	83.0	83.0	
7	6.2	3.3	15.7	16.0	19.2	20.4	84.0	96.4	86.0	83.7	94.2	87.3	86.7	86.6	86.9	85.6	86.1	86.0	86.9	86.1	91.8	87.4	96.2	76.7	83.4	82.6	83.7	83.3	77.1	82.7	82.7	
8	15.8	16.7	5.1	5.5	3.7	4.4	18.4	85.7	93.9	87.3	85.9	88.5	89.6	89.3	89.3	84.2	90.6	89.5	90.0	84.3	84.7	89.2	85.8	79.9	82.7	83.3	82.2	82.1	78.3	83.0	83.0	
9	7.1	3.2	15.2	15.3	16.5	17.2	3.7	16.0	86.6	84.6	93.4	87.2	87.3	87.1	87.5	86.8	86.7	87.2	87.7	86.9	92.4	86.0	95.2	78.6	84.2	83.6	84.3	84.1	79.1	83.7	83.7	
10	13.7	15.1	5.0	5.8	7.2	6.9	15.7	6.4	14.9	88.5	87.6	90.3	90.8	90.7	90.9	85.4	92.7	90.9	91.0	85.7	86.6	91.1	86.5	79.7	83.3	83.5	83.5	83.2	79.2	84.1	84.1	84.1
11	17.9	16.2	13.2	14.2	15.2	14.5	16.7	14.4	17.5	12.8	84.4	91.4	91.6	91.4	91.3	83.6	86.2	90.5	90.8	83.6	84.5	90.7	84.7	79.2	81.6	81.2	81.8	81.6	77.2	82.8	82.8	
12	0.4	6.8	14.2	15.5	16.1	16.5	6.1	15.8	7.0	13.7	17.8	88.5	87.8	87.5	87.5	88.1	87.7	87.4	87.7	88.4	91.9	88.0	94.4	79.3	83.2	83.7	84.2	83.5	79.0	83.6	83.6	
13	12.7	14.0	11.4	12.3	13.5	13.4	14.1	12.9	14.2	10.6	9.2	12.6	95.1	94.8	93.7	85.7	90.3	93.5	94.3	86.0	86.9	94.5	87.7	79.4	83.3	83.4	84.4	84.0	78.7	84.0	84.0	
14	13.5	14.0	10.9	11.2	12.4	12.6	14.9	11.5	14.1	10.0	9.1	13.4	5.1	99.5	93.8	86.3	91.2	94.0	95.7	86.9	86.7	96.6	87.9	80.2	83.5	83.2	83.9	83.3	78.9	84.3	84.3	
15	14.0	14.3	11.1	11.3	12.7	12.7	15.0	11.8	14.3	10.1	9.3	13.9	5.5	0.5	93.7	86.1	91.0	93.7	95.5	86.7	86.3	95.4	87.5	80.1	83.4	83.1	83.7	83.3	78.6	84.1	84.1	
16	14.0	14.6	11.3	10.9	12.9	12.5	14.7	11.8	13.8	9.9	9.4	13.9	6.6	6.6	6.6	85.6	90.5	93.1	94.2	85.9	87.3	94.0	87.3	79.6	83.6	83.3	84.4	83.3	78.9	85.0	85.0	
17	13.1	15.1	18.0	18.9	18.4	18.0	16.6	18.1	15.0	16.5	18.9	13.2	16.1	15.3	15.6	16.3	85.5	85.1	85.4	96.5	88.5	85.9	87.4	78.7	83.9	83.7	84.4	84.1	79.4	84.7	84.7	
18	13.7	14.7	8.3	9.0	10.5	10.2	15.6	10.2	14.9	7.8	13.1	13.6	10.5	9.5	9.7	10.3	16.3	90.9	91.1	85.5	86.6	90.4	86.5	79.6	83.6	84.4	84.1	83.7	78.8	84.8	84.8	
19	14.1	14.3	11.4	11.9	12.4	12.4	15.8	11.5	14.2	9.9	10.3	14.0	6.9	6.3	6.7	7.3	16.9	9.8	93.5	85.5	86.9	93.7	87.1	80.9	83.0	83.5	83.9	83.3	79.6	84.5	84.5	
20	13.6	14.0	11.3	11.3	12.3	12.0	14.7	11.0	13.5	9.8	10.0	13.6	6.0	4.5	4.7	6.1	16.6	9.7	6.9	86.0	86.4	96.1	87.4	79.6	83.5	83.4	84.2	83.6	78.6	84.5	84.5	
21	12.7	15.0	17.6	18.4	18.2	17.9	15.9	17.9	14.9	16.1	18.9	12.8	15.7	14.5	14.8	15.9	1.5	16.3	16.3	15.8	88.9	88.4	87.6	78.6	83.9	84.1	84.4	84.1	79.3	84.7	84.7	
22	8.9	8.8	15.6	16.5	17.9	17.5	8.9	17.4	8.2	15.0	17.7	8.8	14.5	14.9	15.3	14.1	12.8	15.0	14.6	15.3	12.3	87.5	91.6	79.7	84.2	83.2	84.8	84.4	79.3	84.0	84.0	
23	13.3	13.4	11.3	11.7	12.2	13.0	14.1	11.9	13.2	9.7	10.2	13.3	5.8	4.5	4.8	6.3	15.9	10.4	6.7	4.1	15.3	13.9	87.6	80.0	83.0	83.0	84.0	83.5	79.5	84.7	84.7	
24	6.0	5.0	15.1	15.3	16.4	16.8	3.9	15.9	5.0	15.0	17.4	5.9	13.6	13.3	13.8	14.1	14.2	15.0	14.3	14.0	13.9	9.1	13.7	79.0	83.7	84.3	84.5	83.6	79.2	84.5	84.5	
25	24.5	25.3	25.6	27.7	24.1	24.9	28.4	23.6	25.6	24.0	24.6	24.7	24.3	23.2	23.4	24.0	25.4	24.1	22.2	24.1	25.5	24.0	23.5	25.0	79.9	80.7	80.2	80.2	81.3	80.7	80.7	
26	19.1	18.2	19.5	20.2	19.2	20.5	19.1	19.9	17.9	19.1	21.5	19.3	19.1	18.9	19.0	18.8	18.4	18.7	19.5	18.8	18.4	18.0	19.6	18.6	23.6	90.5	96.7	97.8	79.6	90.5	90.5	
27	18.5	19.2	19.7	20.1	18.1	19.5	20.2	19.1	18.8	18.9	22.0	18.7	19.0	19.2	19.4	19.1	18.7	17.7	18.9	19.1	18.1	19.3	19.6	17.8	22.6	10.4	90.7	90.3	79.1	92.6	92.6	
28	17.7	17.6	19.4	19.9	19.9	21.2	18.7	20.5	17.8	18.9	21.1	17.9	17.7	18.3	18.6	17.7	17.7	18.1	18.3	17.9	17.7	17.2	18.2	17.5	23.3	3.4	10.1	96.9	79.7	90.9	90.9	
29	18.7	18.3	19.5	20.3	19.5	21.0	19.2	20.7	18.1	19.2	21.5	18.9	18.2	19.1	19.2	19.1	18.2	18.6	19.2	18.8	18.2	17.8	18.9	18.8	23.2	2.3	10.5	3.2	80.1	90.6	90.6	
30	25.0	24.4	25.9	28.4	26.2	27.0	27.7	25.9	24.9	24.6	27.4	25.1	25.3	25.1	25.5	25.0	24.4	25.2	24.0	25.4	24.5	24.5	24.2	24.7	21.7	24.1	24.8	24.0	23.4	80.2	80.2	
31	18.5	18.7	19.1	19.4	18.4	19.5	20.0	19.5	18.7	18.1	19.7	18.8	18.2	17.7	18.1	17.0	17.4	17.1	17.5	17.6	17.3	18.3	17.2	17.5	22.7	10.4	7.9	10.0	10.3	23.2	100.0	
32	18.5	18.7	19.1	19.4	18.4	19.5	20.0	19.5	18.7	18.1	19.7	18.8	18.2	17.7	18.1	17.0	17.4	17.1	17.5	17.6	17.3	18.3	17.2	17.5	22.7	10.4	7.9	10.0	10.3	23.2	0.0	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32

圖十七、豬隻輪狀病毒 VP6 基因之相似度及歧異度

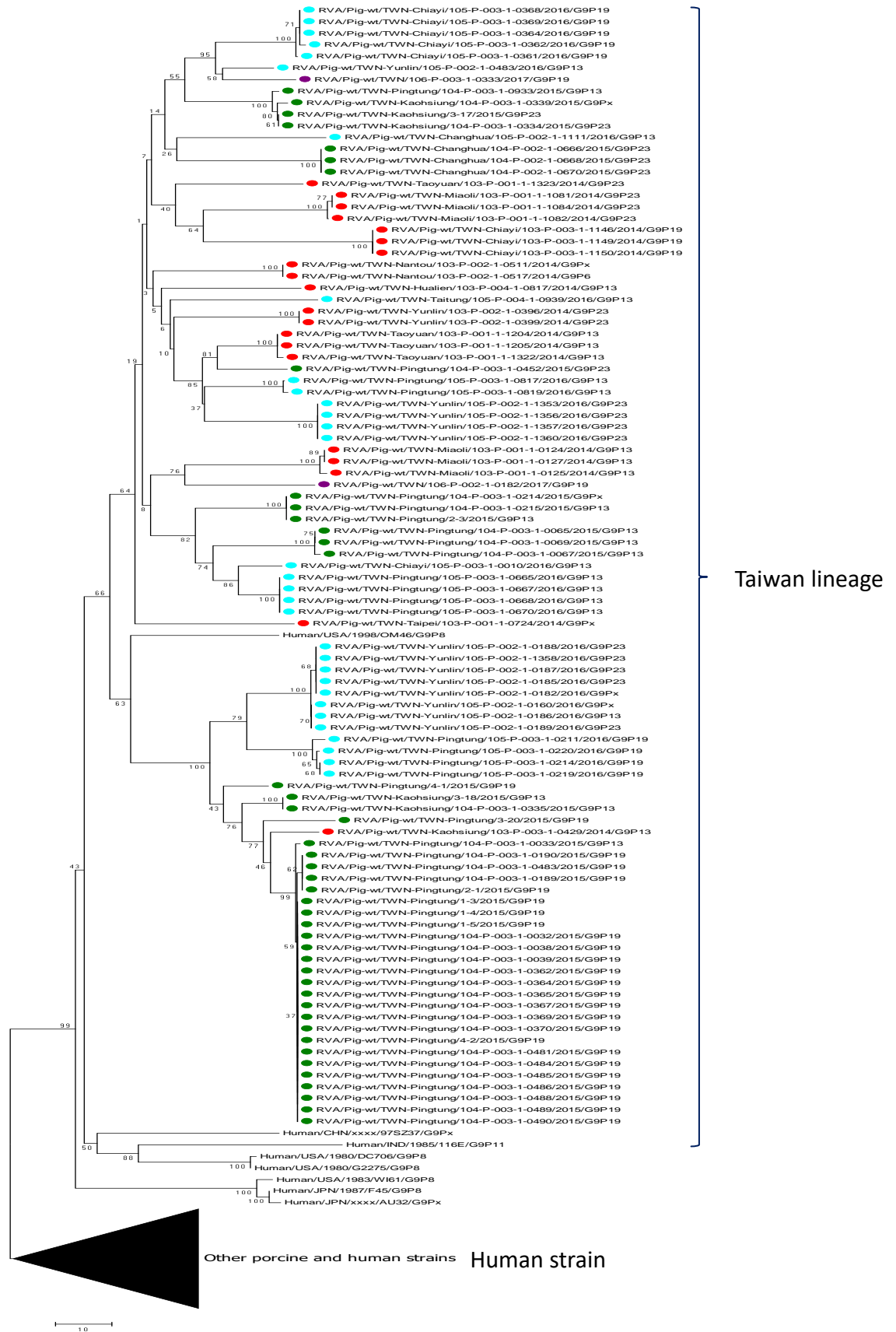


圖十八、豬隻輪狀病毒 VP6 基因之親緣關係

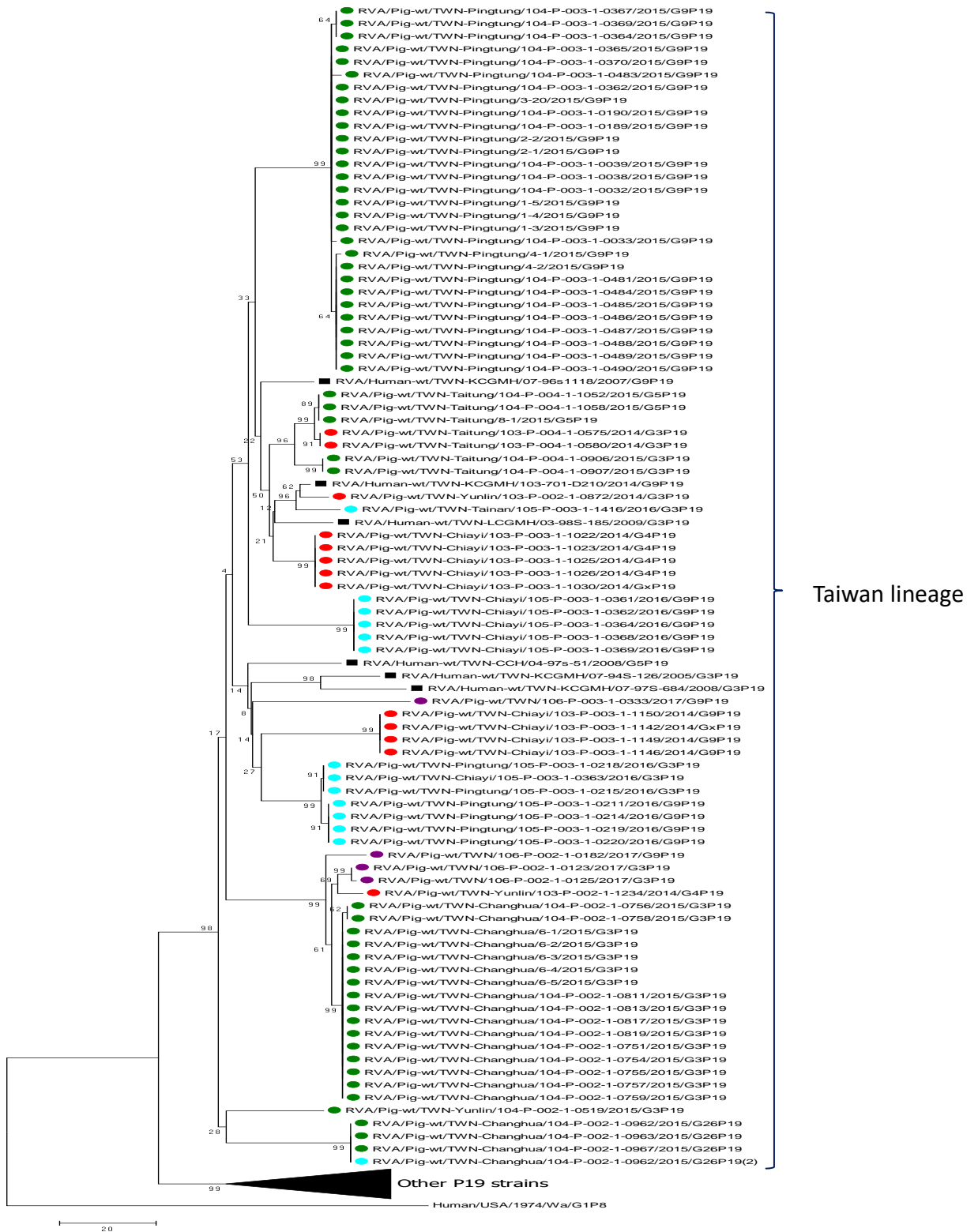


圖十九、輪狀病毒 VP6 與人類之親緣關係

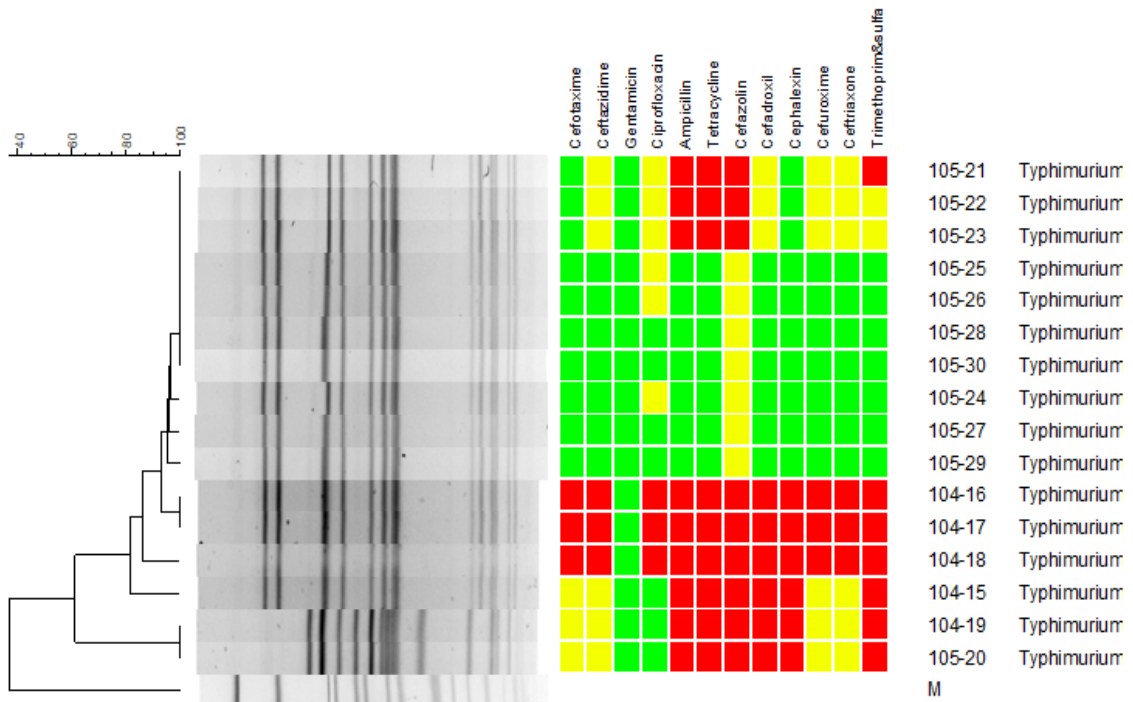




圖二十、輪狀病毒 G9 與人類之親緣關係



圖二十一、輪狀病毒 P19 與人類之親緣關係



圖二十二、沙氏桿菌以脈衝式電泳分析

表一 2014-2017 年不同年齡層對各種病原檢測之陽性頭數

	輪狀病毒			諾羅病毒			沙氏桿菌			產氣莢膜梭菌			困難梭菌			彎曲桿菌			李斯特菌		
	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬
2014	104	24	10	2	6	2	0	4	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2015	20	0	1	0	2	0	1	2	6	8	3	39	1	0	0	0	1	1	0	0	0
2016	7	2	0	0	2	0	1	2	4	73	15	199	23	0	0	0	0	0	0	0	0
2017	3	0	0	0	0	0	0	3	0	23	20	31	8	0	1	3	2	0	0	0	0

表二 2014-2017 年不同年齡層對各種病原檢測之陽性場數

	輪狀病毒			諾羅病毒			沙氏桿菌			產氣莢膜梭菌			困難梭菌			彎曲桿菌			李斯特菌		
	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬	仔豬	肥豬	種豬
2014	32	11	6	2	4	2	0	4	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2015	11	0	1	0	1	0	1	3	5	5	2	8	1	0	0	0	1	1	0	0	0
2016	4	2	0	0	1	0	1	2	3	23	6	35	8	0	0	0	0	0	0	0	0
2017	3	0	0	0	0	0	0	3	1	12	8	12	7	0	1	3	2	0	0	0	0

## 附錄一、台灣畜牧場食媒性病原體相關風險因子問卷調查

### 畜牧場/牧場負責人基本資料

1. 牧場名稱/主人姓名：\_\_\_\_\_
2. 牧場負責人年齡：\_\_\_\_\_ 性別：\_\_\_\_\_ 教育程度 \_\_\_\_\_
3. 負責人畜牧現場工作經驗年資：\_\_\_\_\_ 年
4. 負責人是否為畜牧相關學系畢業？是，否
5. 負責人過去一年參加畜牧專業講習或教育訓練時數：\_\_\_\_\_ 小時
6. 牧場總管理人員有幾位？ \_\_\_\_\_ 人，固定管理人員有幾位？ \_\_\_\_\_ 人
7. 畜牧場坐落鄉鎮地址： \_\_\_\_\_ ；面積： \_\_\_\_\_ 甲 \_\_\_\_\_ 分

### 畜牧場環境設備

8. 總飼養豬隻頭數： \_\_\_\_\_ 隻
9. 主要畜牧設施：  
畜舍部分： \_\_\_\_\_ 舍 \_\_\_\_\_ 棟。管理室。飼（芻）料調配或倉儲設施。  
廢水處理設施。堆肥舍。防疫消毒設施。其他： \_\_\_\_\_
10. 牧場區是否有大門和圍籬？ 是，否
11. 畜舍型式？水濺式豬舍 大棚式豬舍 開放式豬舍，其他： \_\_\_\_\_
12. 飼養場區周圍是否有農田或是濕地等 易聚集野鳥之處？ 是，否
13. 牧場區周圍(半徑 1 公里)是否有養殖場？  
是，請註明：養豬場 養牛場 養禽場 其他： \_\_\_\_\_  
否
14. 牧場區周圍(半徑 1 公里)最近 3 個月內是否有疫情發生？  
是，請註明： \_\_\_\_\_ 否

### 畜牧場管制措施

15. 平日進出牧場區車輛有哪些？ 管理人員 運載車 飼料車 化製車  
其他： \_\_\_\_\_
16. 車輛進出牧場區是否有管制及紀錄？  
是，請註明：管理人員 運載車 飼料車 化製車 其他： \_\_\_\_\_  
否
17. 車輛進出牧場區是否進行消毒？  
是，請註明：管理人員 運載車 飼料車 化製車 其他： \_\_\_\_\_  
否
18. 進出各棟舍間，管理人員是否有進行鞋底消毒？是，否

### 畜牧場消毒設備

19. 牧場區消毒設備種類？ 人員消毒池或消毒踏槽 車輛消毒池或消毒踏槽  
噴霧消毒設施 其他消毒設施，請註明： \_\_\_\_\_
20. 牧場區消毒劑種類： \_\_\_\_\_ 種
21. 牧場區定期清潔頻率？ \_\_\_\_\_ 天清潔乙次(如不同類型豬隻頻率不同，請註明)
22. 牧場區定期消毒頻率？ \_\_\_\_\_ 天消毒乙次(如不同類型豬隻頻率不同，請註明)
23. 消毒池或消毒踏槽之消毒水更換頻率？ \_\_\_\_\_ 天更換乙次

### 畜牧場水源與廢水處理

24. 沖洗畜舍之水來源為何？自來水 地下水 溪水 其他： \_\_\_\_\_
25. 牧場區動物飲用水源為何？自來水 地下水 溪水 其他： \_\_\_\_\_
26. 牧場區供水系統是否有消毒？是，頻率 \_\_\_\_\_ 消毒乙次， 否
27. 牧場區廢水處理設施開啟頻率？自動開啟， 手動開啟，約 \_\_\_\_\_ 開啟乙次

### 飼料管理

28. 飼料槽是否加蓋? 是 否
29. 飼料是否使用添加物? 是, 請註明: 抗生素 益生菌 酵素 有機磷  
奶粉, 其他: \_\_\_\_\_
- 否
30. 添加物是否為自行調配? 是 否

### 人員與動物健康狀況 (2017年採檢畜牧場適用)

31. 最近三個月內是否有人員至其他牧場? 是, 否
32. 最近一個月內是否有牧場人員出現腹瀉或腹痛等腸胃道症狀? 是, 否
33. 最近一個月內牧場產仔數: \_\_\_\_\_ 隻
34. 最近一個月內牧場是否有豬隻出現下痢症狀?  
是, 請註明種類: 種豬 分娩豬 仔豬 離乳仔豬  
否
35. 最近一個月內牧場病死或淘汰數隻數: \_\_\_\_\_ 隻(不含被壓死仔豬),  
請註明種類: 種豬 分娩豬 仔豬 離乳仔豬, 主要原因: \_\_\_\_\_
36. 最近一個月內是否有請獸醫進行診斷及協助?  
是, 請註明原因: \_\_\_\_\_, 否
37. 牧場最近一次請獸醫進行診斷及協助時間與原因: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月, 原因\_\_\_\_\_

## 附件二

### 台灣畜牧場食媒性病原體危險因子問卷調查結果

#### 材料與方法

#### 採樣與檢驗

	103	104	105	106
研究對象	北、中、南、東 每個月各 1 場	採北、中、南、東按豬隻頭數 比例採樣；每個月共採 3 場		
總場數 (場)	48	36	36	預計 36
選定方法	立意取樣，且為一貫場			
動物檢體	不同年齡層（哺乳期、肥育期和種豬）的豬隻 採新鮮糞便檢體各 10 隻，故一場共 30 個檢體			不同年齡層豬隻 採新鮮糞便檢體 各 10 隻，其中肥 育期與哺乳期為 同窩採樣
環境檢體	NA	NA	廢水處理前與廢水處理 後之放流水各取 1 樣本	
總樣本數	1440	1080	1152	預計 1152
檢驗方式	所有病原體皆由屏科大廖明輝教授 實驗室檢驗，其中病毒部分（輪狀病 毒、諾羅病毒）再由疾管署研檢中心 腸道及腹瀉病毒實驗室作 double check		同 103、104 年，唯產氣莢膜梭菌、 困難梭菌改委託部南醫院檢驗	
病原體	E 型肝炎病毒、輪狀病毒、諾羅病 毒、沙門氏菌、毒素型大腸桿菌、李 斯特菌、彎曲桿菌、產氣莢膜梭菌、 困難梭菌、阿米巴原蟲、梨形鞭毛 蟲、隱孢子蟲、弓蟲		輪狀病毒、諾羅病毒、沙門氏菌、 李斯特菌、彎曲桿菌、產氣莢膜梭 菌、困難梭菌	

	103	104	105	106
<b>問卷蒐集對象</b>	對 103-105 年度有加入研究計畫之畜牧場進行回溯性訪談			採樣同時進行訪談
<b>訪談對象</b>	畜牧場負責人或場長			
<b>訪談方式</b>	面訪，由研究人員詢問訪談對象後填寫問卷			
<b>問卷題目</b>	畜牧場基本資料、畜牧場環境設備、管制措施、消毒設備、水源與廢水處理、飼料管理等題組			新增「人員與動物健康狀況」、「牧場區周圍(半徑 1 公里)最近 3 個月內有疫情發生」題目

## 資料處理

- 將收集到之問卷資料與檢驗結果整理後，登錄於 Epi Info 7 version 7.2.1.0 統計軟體並進行分析
- 畜牧場食媒性病原體危險因子分析
- 分析變項：畜舍型態、飼料添加物(含抗生素使用)、畜牧場管制措施、畜牧場消毒設備、畜牧場周圍有野鳥聚集處、季節分布
- ◎ **106 年問卷**新增：動物健康狀況、畜牧場周圍最近 3 個月內有疫情發生
- ◎ 檢驗結果病原體之**產氣英膜梭菌**、**困難梭菌**因 105 年後委外檢驗方式較固定，故僅取 **105-106 年度**檢驗結果納入分析

## 收案結果

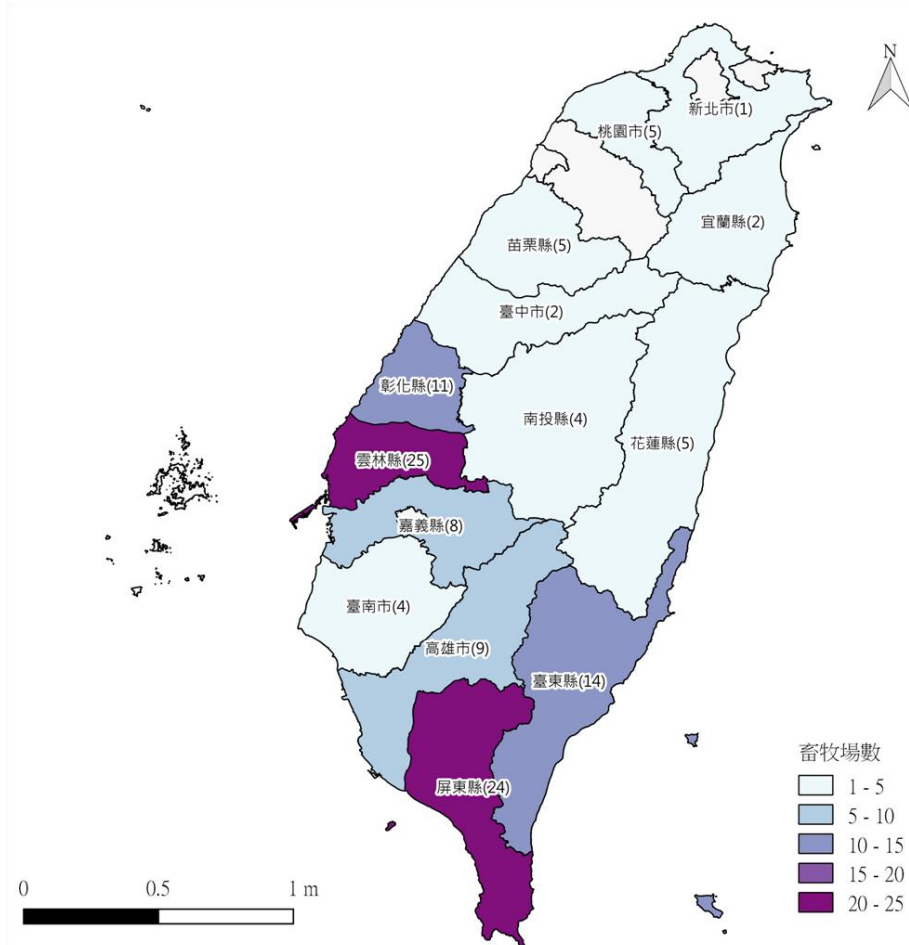
目前訪談完成場：119 場

年度	場數
103	35/48 (73%)
104	20/36 (56%)
105	34/36 (94%)
106	30/36 (83%)



收案畜牧場規模

變項	場數(n=119)	全國場數	百分比	
總飼養豬隻頭數(隻)	1 - 99	0	2493	0.0%
	100 - 199	0	882	0.0%
	200 - 299	1	398	0.3%
	300 - 499	1	683	0.1%
	500 - 999	21	1498	1%
	1000 - 1999	40	1043	4%
	2000 - 2999	19	205	9%
	3000 - 4999	10	137	7%
	5000 +	27	129	21%
地理位置	北	8	1373	0.6%
	中	47	2327	2%
	南	45	3283	1.3%
	東	19	1263	1.5%



## 基本資料

---

變項	場數(n=119)
牧場負責人性別	
男	119 (100%)
女	0 (0%)
牧場負責人年齡 [median (range)]	54 (27 - 78)
牧場負責人為畜牧相關學系(含畜牧獸醫)畢業	38 (32%)
場長為獸醫師/獸醫佐+1	16 (13%)
牧場負責人畜牧現場工作經驗年資(年) [median (range)]	28 (2 - 50)
牧場負責人過去一年參加畜牧專業講習或教育訓練時數 [median (range)]	20 (0 - 200)
牧場總管理人員有幾位(人) [median (range)]	3 (1 - 44)
固定正職管理人員有幾位(人) [median (range)]	3 (1 - 25)
總飼養豬隻頭數(隻) [median (range)]	1720 (200 - 30000)
最近一個月內牧場產仔數(隻) [median (range)]	250 (30 - 6000)
最近一個月內牧場病死或淘汰數隻數(隻)(不含被壓死仔豬) [median (range)]	14 (0 - 1086)

---

畜牧場環境設備

變項	場數(n=119)	%
畜舍型態		
水濼式豬舍	28	24%
開放式豬舍	106	89%
牧場區周圍(半徑 1 公里)有養殖場		
養豬場	80	67%
養牛場	13	11%
養禽場	38	32%
牧場區周圍(半徑 1 公里)最近 3 個月內有疫情發生 (106 年)	1/30	3%
主要畜牧設施		
管理室	100	84%
飼(芻)料調配或倉儲設施	85	71%
廢水處理設施	116	97%
堆肥舍	106	89%
防疫消毒設施	109	92%
牧場區有大門和圍籬	106	89%
飼養場區周圍有農田或是濕地等易聚集野鳥之處	56	47%

畜牧場管制措施：

變項	場數(n=119)	%
平日進出牧場區車輛	112	94%
管理人員	93	78%
運載車	82	69%
飼料車	90	76%
化製車	24	20%
車輛進出牧場有管制及紀錄	61/112	54%
管理人員	36/93	39%
運載車	40/82	49%
飼料車	41/90	46%
化製車	17/24	71%
車輛進出牧場區有進行消毒	90/112	80%
管理人員	57/93	61%
運載車	62/82	76%
飼料車	67/90	74%
化製車	20/24	83%
進出各棟舍間，管理人員有進行鞋底消毒	77	65%

畜牧場消毒設備：

變項	場數(n=119)	%
牧場區消毒設備種類		
人員消毒池或消毒踏槽	85	71%
車輛消毒池或消毒踏槽	39	33%
噴霧消毒設施	115	97%
其他消毒設施	1	1%
牧場區消毒劑種類 [median (range)]	4 (1-10)	
牧場區定期清潔頻率(天) [median (range)]	2 (1-15)	
牧場區定期消毒頻率(天) [median (range)]	7 (1-10)	
消毒池或消毒踏槽之消毒水更換頻率(天) [median (range)]	3 (0-10)	

畜牧場水源與廢水處理

變項	場數 (n=119)	%
沖洗畜舍之水來源為何		
自來水	0	0%
地下水	113	95%
溪水	4	3%
山泉水	2	2%
牧場區動物飲用水源為何		
自來水	7	6%
地下水	108	91%
溪水	2	2%
山泉水	2	2%
牧場區供水系統有消毒	18	15%
牧場區廢水處理設施開啟方式頻率		
自動開啟	115	97%
手動開啟	2	2%

飼料管理：

變項	場數(n=119)	%
飼料槽加蓋	113	95%
飼料使用添加物	111	93%
抗生素	89	75%
益生菌	103	87%
酵素	99	83%
有機磷	12	10%
奶粉	22	18%
有機酸	14	12%
靈芝豬飼料	2	2%
添加物為自行調配	62	52%

人員與動物健康狀況 (106 年)

變項	場數(n=30)	%
最近三個月內有人員至其他牧場	2	7%
最近一個月內有牧場人員出現腹瀉或腹痛等腸胃道症狀	0	0%
最近一個月內牧場有豬隻出現下痢症狀	11	37%
種豬	1	3%
仔豬	10	33%
肥育豬	4	13%
最近一個月內牧場病死或淘汰豬種類	29	97%
種豬	1	3%
仔豬	17	57%
肥育豬	13	43%
最近一個月內有請獸醫進行診斷及協助	10	33%



病原檢測結果

陽性場為 112 場 (112/119, 94%)

以畜牧場及各縣市區分病原體陽性結果

病原體 縣市名(場數)	輪狀病毒	產氣莢膜梭菌	困難梭菌	沙門氏菌	彎曲桿菌	諾羅病毒
台中市(2)		2				
台東縣(14)	5	6	1	2	2	
台南市(4)	1	2				
宜蘭縣(2)		2		1		
花蓮縣(5)	4			1		
南投縣(4)	3	2				
屏東縣(24)	7	16	5	4		2
苗栗縣(5)	1	2	1	2		1
桃園市(5)	4					1
高雄市(9)	4	4	3		3	
雲林縣(25)	7	14	3	6	1	2
新北市(1)	1					
嘉義縣(8)	3	5		1	2	1
彰化縣(11)	2	5	3	4		1
總數 (119)	42	60	16	21	8	8

以畜牧場及不同豬隻年齡層與環境樣本區分病原體陽性結果（陽性場）

病原體

輪狀病毒 產氣莢膜梭菌 困難梭菌 沙門氏菌 彎曲桿菌 諾羅病毒

樣本種類(場數)

仔豬 (119)	37	41	15	2	5	2
種豬 (119)	6	51	1	10	1	1
肥豬 (119)	9	18	0	9	3	6
廢水處理前 (64)	0	9	0	0	0	0
廢水處理後 (64)	0	3	0	0	0	0
總數 (119)	42	60	16	21	8	8

以樣本數及不同豬隻年齡層與環境樣本區分病原體陽性結果（陽性數）

病原體	輪狀病毒	產氣莢膜梭菌	困難梭菌	沙門氏菌	彎曲桿菌	諾羅病毒
樣本種類(數量)						
仔豬 (1190)	108	93	31	2	5	2
種豬 (1190)	8	234	1	14	1	1
肥豬 (1190)	16	31	0	9	3	9
廢水處理前 (64)	0	9	0	0	0	0
廢水處理後 (64)	0	3	0	0	0	0
<b>總數 (3286)</b>	<b>132</b>	<b>370</b>	<b>32</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>12</b>

依季節區分病原體檢驗結果（陽性場）

數量

25

20

15

10

5

0

輪狀病毒

產氣莢膜梭菌

困難梭菌

沙門氏菌

彎曲桿菌

諾羅病毒

春 夏 秋 冬

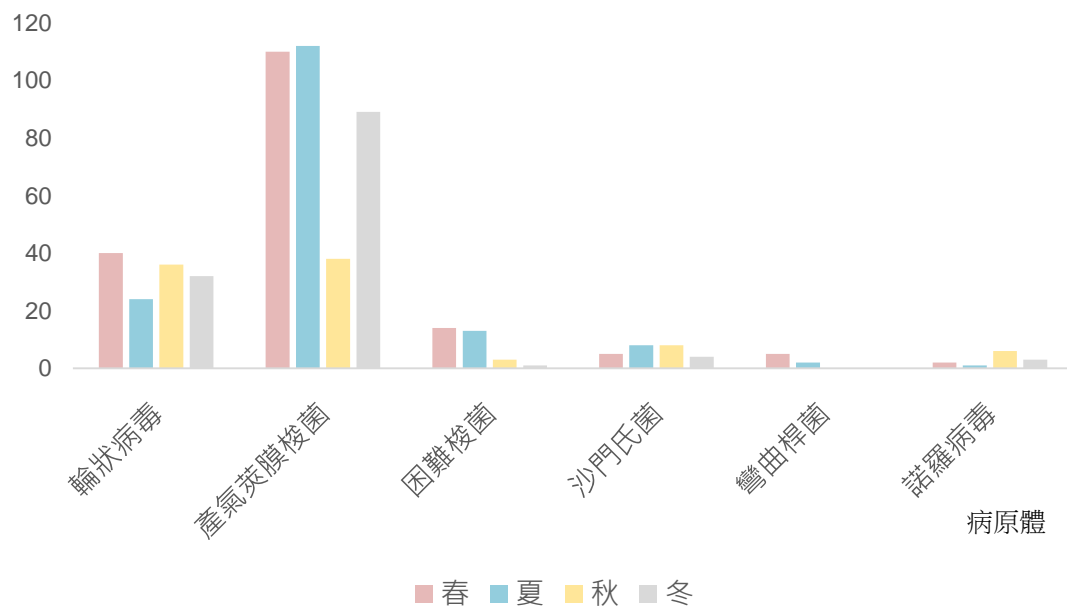
病原體

註 1：產氣莢膜梭菌、困難梭菌因 105 年後委外檢驗方式較固定，故僅取 105-106 年度檢驗結果納入分析

註 2：季節判定依(1)採樣時間非訪談時間；(2)春 3-5 月、夏 6-8 月、秋 9-11 月、冬 12-2 月

依季節區分病原體檢驗結果（陽性數）

數量



註 1：產氣莢膜梭菌、困難梭菌因 105 年後委外檢驗方式較固定，故僅取 105-106 年度檢驗結果納入分析

註 2：季節判定依(1)採樣時間非訪談時間；(2)春 3-5 月、夏 6-8 月、秋 9-11 月、冬 12-2 月