

計畫編號： MOHW105-CDC-C-315-000125

衛生福利部疾病管制署 105 年度科技研究發展計畫

毒蛇寄生蟲感染調查和防治研究計畫

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心(疫苗中心)

計畫主持人：鄭雅芬

研究人員：江玟徹、蔡承龍

執行期間：105 年 7 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

目錄

中文摘要	3
英文摘要	4
1. 前言	5
2. 材料與方法	9
2.1. 檢體收集	9
2.2. 糞便檢查	9
2.2.1. 直接塗抹法 (Coverglass thin smear)	9
2.2.2. 飽和浮游法 (Flotation)	9
2.2.3. 福馬林-乙醚離心沉澱法 (Centrifugal sedimentation)	9
2.2.4. 三色寄生蟲原蟲卵染色	10
2.3. 寄生蟲檢查	10
2.4. 分子生物學檢查	11
2.4.1. 糞便 DNA 純化	11
2.4.2. 引子設計	11
2.4.3. 聚合酶連鎖反應	12
2.4.4. DNA 定序與比對	12
3. 結果	15
3.1. 糞便檢查	15
3.1.1. 直接塗抹、飽和浮游、福馬林-乙醚離心沉澱法	15
3.1.2. 三色寄生蟲原蟲卵染色	15
3.2. 寄生蟲檢查	15
3.3. 分子生物學檢查	16
4. 討論與建議	17
5. 參考文獻	23
6. 圖次	25

中文摘要

本研究主要針對本署圈養毒蛇進行寄生蟲感染檢測，用以了解毒蛇寄生蟲感染現況。檢測部分包含糞便檢查（直接塗抹法、浮游法、離心沉澱法）、分子生物學檢查及寄生蟲形態學檢查等。糞便檢查發現線蟲、五口蟲及吸蟲蟲卵。寄生蟲形態學檢查發現線蟲類包含消化道內線蟲，蛇蛔蟲及肺線蟲、條蟲及兩種五口蟲。寄生部位包含肺、氣囊、體腔、肝臟及消化道內。已建立 3 種分子生物學檢查方法用以檢測糞便內隱孢子蟲、阿米巴原蟲及五口蟲之 DNA，並於檢體中發現隱孢子蟲及五口蟲感染。未來將參考本研究成果調整本署毒蛇檢疫期間運作模式，包含增加糞便檢查頻率，將分子生物學檢驗納入常規檢驗，並增加抗寄生蟲藥物施打種類，以確保動物檢疫效果。

關鍵詞：毒蛇、寄生蟲、糞便檢查、組織病理學檢查、聚合酶連鎖反應

英文摘要

The aim of this study focuses on the endoparasitic infections of venom snakes in captive. The specimens from clinical and necropsy are feces and snake tissues. The exams include smear, flotation, centrifugal sedimentation, endoparasites morphology findings and detect the endoparasites' DNA by PCR. At result, the eggs of nematode, trematode and pentastomids were detected by feces exam. The nematode (*Kalicephalus* sp. *Ophidascaris* sp. and *Rhabdias* sp.), tape worm and pentastomids (*Armillifer agkistrodontis* and *kiricephalus pattoni*) were found at necropsy. The PCR method was detect the DNA of cryptosporidium and pentastomids in feces sample. The study suggests to increase to frequent of feces exam and increase the PCR method to regular test at quarantine.

Key words: venom snake, parasite, fecal exam, histopathology, PCR

1. 前言

毒蛇飼養管理為抗蛇毒血清製程管理之源頭；健康、體質量佳之毒蛇可給予質量俱佳之蛇毒，供進行後續相關實驗，以備製抗蛇毒血清。寄生蟲感染常造成感染毒蛇營養不良，不同寄生蟲依據其生活史有不同之寄生部位，除營養不良外亦常造成毒蛇死亡，如五口蟲（pentastomids）可寄生於毒蛇肺臟內，成熟蟲體可阻塞氣管造成窒息死亡。

蛇類常見寄生蟲包含線蟲、吸蟲、條蟲及五口蟲。線蟲類主要可見消化道內線蟲（*Kalicephalus* sp.）、蛇蛔蟲（*Ophidascaris* sp.）及肺腺蟲（*Rhabdias* sp.）、條蟲類為 *Ophiotaenia* sp.、吸蟲類 *Paradistomum megareceptaculum* 及五口蟲 *Armillifer agkistrodontis*、*kiricephalus pattoni*、*Raillettiella orientalis*。此外，原蟲類隱孢子蟲及阿米巴原蟲亦曾有文獻指出可感染蛇隻。

蛇蛔蟲體長約 51 - 82 mm 間，其蟲體於組織切片下可見發達之肌肉層，其生活史於幼蟲期會移行至肝臟，形成結節樣囊泡，並造成肝臟組織壞死，成蟲寄生於蛇之胃壁。消化道內線蟲主要寄生於消化道（食道、胃及小腸）中，體長約為 7.5 - 13.5 mm。肺腺蟲體長約 9 - 12 mm，其生活史之寄生世代為雌雄同體，蟲卵內可見幼蟲。

吸蟲類主要寄生於蛇之膽管及膽囊內，體長約 5.2 - 8.4 mm，體型呈長圓形，雌雄同體，其蟲卵為黃棕色。條蟲類主要寄生於腸道內，可見其未發育及成熟之節片。

五口蟲 *Armillifer* sp.、*kiricephalus* sp.、*Raillietiella* sp. 均可寄生於肺臟及氣囊內。*Armillifer* 屬共有 7 種皆可感染蛇隻，其中 *Armillifer agkistrodontis* 僅在台灣被發現，且其環節為 *Armillifer* sp.屬中最少。*Kiricephalus* 屬共有 5 種，主要以其環節數目、宿主及分布區域不同作為區別。其中 *Kiricephalus pattoni* 主要以印度、亞洲及澳洲蛇類感染為主。其蟲體特徵主要可見明顯的頸部及膨大頭部，並可於蛇體腔內見其幼蟲分佈。*Raillietiella* sp. 屬共有 34 種，依其體型、尾葉型態、雌蟲蟲體長度、宿主及地理分布的可再細分為五群。

蛇隻寄生蟲及原蟲感染除依不同種類造成嚴重程度不一之症狀外，亦可造成人畜共通傳染之症狀。隱孢子蟲及阿米巴原蟲均可藉由受感染蛇隻持續排放具感染力之糞便，造成其他蛇隻及人員之感染。其他寄生蟲部分，除了蟲體迷入至人體造成之損傷外，條蟲或五口蟲 *Armillifer agkistrodontis* 均有人類感染之病例報告。

依過往毒蛇解剖經驗，均曾在組織病理學檢查時，發現線蟲、條蟲及五口蟲等寄生蟲感染狀況，發現部位包含呼吸道、肺臟、肝臟、腸道及體腔內。故寄生蟲感染不僅影響毒蛇健康，亦對於相關工作人員，如獸醫師、飼養管理人員、採毒操作人員、清潔人員造成感染風險。

本研究主要對象為本署圈養毒蛇，取得其糞便檢體，進行糞便檢查，了解是否有蟲卵、原蟲感染等證據。死亡毒蛇部分則將進行完整組織病理學檢查，於剖檢過程中，取得寄生蟲蟲體進行形態學鑑定，判讀是否有線蟲、吸蟲或原蟲類之感染。同時擬嘗試藉由糞便檢體進行分子生物學檢測，用以判定有無寄生蟲感

染。

根據本研究之結果，預期可了解本署圈養毒蛇之寄生蟲感染現況，包含感染率及寄生蟲種類等相關訊息，藉由這些訊息，用以調整毒蛇寄生蟲之驅蟲計畫。同時據以精進相關人員防護措施及操作方式，降低人員感染之風險。

2. 材料與方法

2.1. 檢體收集

共收集糞便檢體 65 例，其中以保定擠壓蛇體直接採集的檢體共 47 例，直接採集飼養箱內新鮮排遺之檢體共 18 例。所有糞便檢體均進行直接塗抹、飽和浮游、福馬林-乙醚離心沉澱、三色寄生蟲原蟲卵染色法及萃取其糞便 DNA。

毒蛇病理解剖共進行 21 例，所有病理解剖均檢查心、肺、肝、膽、腎、胃、腸道及體腔。並收集肺、腸道、膽囊及腸內容物進行後續判定。

2.2. 糞便檢查

2.2.1. 直接塗抹法 (Coverglass thin smear)

取約 1 g 之糞便檢體，於在載玻片上加入 0.9 % 生理食鹽水均勻混合，蓋上蓋玻片後置於光學顯微鏡下鏡檢。

2.2.2. 飽和浮游法 (Flotation)

取約 1 g 之糞便檢體，加入裝有 10 mL 蒸餾水之離心管內均勻混合，使用漏斗及以蒸餾水沾濕之紗布過濾至另一 15 mL 離心管內，以 2,000 - 2,200 rpm 離心 2 分鐘後取出，去其上清液，再加入 10 mL 飽和食鹽水混和均勻後，持續於新離心管內加入飽和生理食鹽水，使其液體因表面張力而突出管壁，靜置 60 分鐘後以蓋玻片沾其表面液體後蓋於載玻片上以光學顯微鏡進行鏡檢。

2.2.3. 福馬林-乙醚離心沉澱法 (Centrifugal

sedimentation)

取約 1 g 之糞便檢體，加入裝有 10 mL 蒸餾水之離心管內均勻混合，使用漏斗及以蒸餾水沾濕之紗布過濾至另一 15 mL 離心管內，以 2,000 - 2,200 rpm 離心 2 分鐘後取出，去其上清液，再加入 8 mL 10 % 中性福馬林攪拌均勻後靜置 20 分鐘，再加入 4 mL 乙醚，乙醚加入後需迅速強力搖晃震盪約 10-15 秒，再以 2,000 - 2,200 rpm 離心 2 分鐘後取出，此時可見所有溶液及檢體分層，由下往上依序為離心沉澱物、福馬林、糞層及乙醚，將最上面三層去除後僅留離心沉澱物，取沉澱物以光學顯微鏡鏡檢。

2.2.4. 三色寄生蟲原蟲卵染色

採用市售三色寄生蟲原蟲卵染色液 (Trichrome stain solution) 進行染色。首先滴 1 滴 PVA (polyvinyl alcohol) 於載玻片上，接著取少量糞便檢體與 PVA 混合均勻後抹開，自然風乾。將已風乾之玻片依序加滿 Lugol Alcohol、70 % Alcohol、Trichrome stain、90 % Acid Alcohol、100 % Alcohol、xylene 於玻片上，每一種溶液分別靜置 10 分鐘、5 分鐘、30 分鐘、1 分鐘、5 分鐘、5 分鐘。加入下一種溶液前須先將前一種溶液倒掉。最後以 permount solution 封片以光學顯微鏡進行觀察。

2.3. 寄生蟲檢查

死亡毒蛇將進行病理解剖，首先將頭部與軀幹分離，頭部移至離解剖區域較遠之一側，小心不要碰觸毒牙。將軀幹翻面使其腹側朝上，沿腹中線切開體腔，

待觀察體腔後將臟器取出：首先提起心臟將其連肺臟、氣管、食道一併取下、接著依肝、胃、膽囊及脾臟分別取下，最後提起腸道將其連生殖腺及腎臟一併取下。

解剖程序：先觀察各臟器有無寄生蟲寄生，取肺臟、膽囊、消化道片段及以手術刀刮取腸黏膜，分別裝入內含 0.65 % 生理食鹽水之 50 mL 離心管內，放入超音波振盪器中，反覆震盪，再倒入培養皿內，以解剖顯微鏡鏡檢觀察。

所發現之蟲體再放入內含 0.9 % 生理食鹽水內，使用超音波振盪器反覆清洗震盪蟲體，清洗後之線蟲及五口蟲將先放入熱水中使蟲體舒展開來，再置入 10 % 中性福馬林固定。固定後之蟲體以解剖顯微鏡進行觀察。

2.4. 分子生物學檢查

2.4.1. 糞便 DNA 純化

將 65 例糞便檢體每例取約 180 - 200 mg 糞便，利用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 參考其實驗步驟並改良自 (Hawash, 2014) 將糞便裂解溫度提高至 95 °C 放置 10 分鐘及處理 InhibitEX tablet 時間提高至 5 分鐘，用以提升糞便蟲卵 DNA 抽出率，最後糞便 DNA 以 100 µL AE buffer 回溶。

2.4.2. 引子設計

參照文獻設計引子

Primer ID	Sequence (5'-3')	Target gene	Reference
Cry-9 (F)	GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG	隱孢子蟲 COWP (Cryptosporidium COWP)	(Spano 等, 1997)
Cry-15 (R)	GTAGATAATGGAAGAGATTGTG	隱孢子蟲 COWP (Cryptosporidium COWP)	(Spano 等, 1997)

EH1F	AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG	阿米巴原蟲 18S rRNA (<i>Entamoeba histolytica</i> 18S rRNA)	(Khairnar 等, 2007)
EH2R	AAGAGGTCTAACCGAAATTAG	阿米巴原蟲 18S rRNA (<i>Entamoeba histolytica</i> 18S rRNA)	(Khairnar 等, 2007)
Pent629F	CGGTAAAAAGCTCGTAGTTGG	五口蟲 18S rRNA (<i>Pentastome</i> 18S rRNA)	(Tappe 等, 2011)
Pent629R	GGCATCGTTTATGGTTAGAACTAGGG	五口蟲 18S rRNA (<i>Pentastome</i> 18S rRNA)	(Tappe 等, 2011)

2.4.3. 聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應體系為：DreamTaq PCR Master Mix (2X) 25 μ L，上下游引子 (10 μ mol/L) 各 2 μ L，糞便 DNA 2 μ L，加 ddH₂O 水至 50 μ L。反應條件為：94 $^{\circ}$ C 5 分鐘；94 $^{\circ}$ C 30 秒，依目標基因最適黏合溫度而定 (*Cryptosporidium*: 56 $^{\circ}$ C、*Entamoeba histolytica*: 60 $^{\circ}$ C、*Pentastome*: 53 $^{\circ}$ C) 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 40 個迴圈；72 $^{\circ}$ C 10 分鐘，聚合酶連鎖反應產物以 2 % agarose gel 進行電泳確認，陽性控制組 (positive control) 為由本署寄生蟲實驗室分讓 genome DNA 或死亡毒蛇病理解剖後蟲體而來。

2.4.4. DNA 定序與比對

Cryptosporidium、*Entamoeba* 及 *Pentastome* DNA 產物大小分別為 550 bp、439 bp 及 430 bp，將正確大小的聚合酶連鎖反應產物送波仕特生物科技股份有限公司進行定序，定序結果連上 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站的核酸資料庫

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) 進行核酸序列

比對。

3. 結果

3.1. 糞便檢查

3.1.1. 直接塗抹、飽和浮游、福馬林-乙醚離心沉澱法

所有糞便檢體共 65 例，其中 47 例為保定直接採集之檢體，均無任何蟲卵之發現。18 例為自飼養籠內發現之糞便檢體，經飽和浮游法檢測共發現 3 例陽性檢體，所發現蟲卵應為線蟲蟲卵。經福馬林-乙醚離心沈澱法檢驗共發現 4 例陽性病例，其中 3 例為吸蟲蟲卵，1 例為五口蟲蟲卵。

3.1.2. 三色寄生蟲原蟲卵染色

三色寄生蟲原蟲卵染色法陽性判定的標準為染色結果可見藍綠帶紫色的阿米巴原蟲的 cyst 及 trophozoites 內之 cytoplasm，可見紅色或紅紫色之阿米巴原蟲的 nuclear chromatin，及染色結果為紅色之阿米巴原蟲蟲卵及幼蟲。本次實驗所有檢體共 65 例並無發現任何陽性病例。

3.2. 寄生蟲檢查

本次共進行 21 例病理解剖，所有病理解剖均檢查心、肺、肝、膽、腎、胃、腸道及體腔，並以解剖顯微鏡觀察肺、腸道、膽囊及腸內容物，確認寄生蟲感染現況。經檢查發現線蟲類，五口蟲及條蟲。線蟲類經判斷共有 3 類，包括消化道內線蟲 (*Kalicephalus sp.*)、蛇蛔蟲 (*Ophidascaris sp.*) 及肺線蟲 (*Rhabdias sp.*)，其分別被發現於消化道（胃及腸道）內、體腔、肝臟表面及肺臟。五口蟲經判斷

共有 2 類，分別為 *Kiricephalus sp.* 及 *Amillifer sp.*，兩者主要均發現於肺臟內，前者主要發現於龜殼花及赤尾鮫，後者發現於百步蛇。條蟲僅有 1 例病例，主要發現腸道中下段。

3.3. 分子生物學檢查

所有糞便檢體 65 例，利用聚合酶連鎖反應檢查 3 種寄生蟲，其中隱孢子蟲發現 1 例 (Fig. 22)，聚合酶連鎖反應產物經定序並進行核酸序列比對後確認為陽性；阿米巴原蟲無發現 (Fig. 23) 及五口蟲發現 6 例 (Fig. 24)，聚合酶連鎖反應產物經定序並進行核酸序列比對後確共 3 例認為陽性。

4. 討論與建議

本次試驗共嘗試兩種糞便採集方式，一種為直接保定毒蛇，以溫柔不強力壓迫方式，直接擠壓消化道收集之。另一種則於飼養管理例行觀察時，採集飼養籠內相對新鮮之糞便，新鮮糞便的判定標準以是否仍保持濕潤為主。

於實驗設計時，因文獻指出，糞便檢體需以新鮮為主，通常於排出後 3 小時內完成相關檢查。初時因無法判斷飼養籠內糞便之排泄時間及新鮮與否，故先採直接擠壓消化道的方式收集檢體，但直接擠壓獲得之檢體多為清澈腸液及類似尿酸鹽結晶物，不似日常觀察所見之糞便型態，且以此方式所得之檢體，即使已先進行濃縮（大量檢體先離心濃縮取其沈澱物）再進行相關操作觀察，於鏡檢下仍無所獲。爰改以直接採集已排出於飼養籠內之糞便檢體進行相關實驗，惟僅挑選外觀看起來相對新鮮之糞便檢體進行採集，新鮮與否之標準主要是觀察糞便檢體是否仍呈濕潤狀態，而非已成乾燥樣，用以確保檢體相對呈現新鮮狀態。但此方式除了無統一標準用以判斷檢體品質之外，也因各蛇隻進食狀況、排泄時間及觀察時間之差異，造成可用以檢測之檢體收集不易。

糞便檢體均進行直接塗抹、過飽和溶液及沈澱法等 3 種方式檢驗，另以三色寄生蟲原蟲卵染色法檢測阿米巴原蟲。同一種檢體以 3 種檢驗方式所得結果通常無法完全吻合。其中直接塗抹法雖最為快速便捷，但檢出率極低，僅見一例疑似蟲卵之病例。過飽和溶液法均檢出疑似線蟲類之蟲卵，而沈澱法則檢出疑似五口蟲及吸蟲類之蟲卵。

整體而言，於糞便檢體中發現蟲卵之比例並不高，造成這樣的結果推測可能

原因有：

1. 蟲卵密度不高造成檢驗不易。
2. 因糞便檢體均取約 1 g 進行相關試驗，但蛇類糞便之組成通常非均質組成，除了消化後之食餌（小鼠）殘渣外，尚包含尿酸鹽結晶，食餌難以消化之皮毛等，故於採樣時不易獲得預期希望觀察的部分，此為直接塗抹法難以檢出之原因，因為很多時候以此法鏡檢都只看到毛髮而已。
3. 因光學顯微鏡鏡檢觀察，通常一片檢體主要觀察 10 個視野用以確定判斷，可能發生沒有觀察到的情況。

根據相關文獻指出，糞便檢查之檢出率多為 20 % 左右，影響結果的原因包含檢體本身蟲卵分布狀況、採樣方式、檢查方式及檢測人員之經驗與敏感度。故糞便檢查結果為陰性可能僅為偽陰性。若將此方式應於檢疫期之檢測，通常須多次進行後方可認定為陰性。

死亡蛇隻解剖寄生蟲檢查部分，主要發現五口蟲 2 種、線蟲類 3 種及條蟲。分布部位包含肺臟、胃、腸道內，另可於體腔及肝臟表面發現。文獻指出寄生蟲感染常見程度依序為條蟲類、線蟲類、吸蟲類及五口蟲。但於本次解剖所發現感染狀況以線蟲類最高，其次為五口蟲，條蟲感染僅 1 例，吸蟲類並無於解剖時間內檢出。造成這異樣的差異推測可能原因為文獻研究材料主要來自野外蛇隻包含各式蛇種，而本實驗均以圈養毒蛇為主，種類以龜殼花最多。不同寄生蟲類所分布之位置並不相同，五口蟲主要分布於肺臟內外，有時可見其移行於體腔中。線蟲類主要內分布於肺臟及消化道內（包含胃及 12 指腸）。條蟲主要見於小腸中

後段。解剖顯微鏡下之膽囊均無發現吸蟲感染。

線蟲類經鑑別認為應分別為消化道內線蟲 (*Kalicephalus sp.*)、蛔蟲 (*Ophidascaris sp.*)及肺線蟲(*Rhabdias sp.*)。消化道內線蟲主要寄生於消化道內，文獻指出包含食道、胃及小腸均有檢出。於本次檢驗中主要以胃及小腸為主。傳染途徑主要為經口感染第三期幼蟲，嚴重的消化道內線蟲感染將造成消化道出血性潰瘍及消化道阻塞。蛔蟲病變以幼蟲移行造成之組織損傷及成蟲寄生於消化道管壁為主，嚴重的蛔蟲感染將造成消化道阻塞。兩者臨床症狀均包含非特異性之厭食、活動力下降及死亡。肺線蟲寄生世代為雌雄同體，此蟲主要寄生部位為肺臟，臨床症狀包含口腔感染及其他嚴重之呼吸道症狀。傳染途徑以直接接觸感染為主。

五口蟲共發現 *Kiricephalus sp.*及 *Amillifer sp.*兩類，前者主要發現於龜殼花及赤尾鮫，後者僅發現於百步蛇。五口蟲 *Armillifer agkistrodontis* 之體長約 8 - 42 mm，雌蟲較雄蟲大且體環節較雄蟲少 1 環（雌蟲環節為 7，雄蟲為 8），其中間宿主主要為哺乳類，其終宿主為爬蟲類。五口蟲 *Kiricephalus sp.*之中間宿主包含兩棲類、爬蟲類及哺乳類，其終宿主為蛇類。五口蟲於自然感染下通常不會造成明顯炎症反應，但另有文獻指出 *Amillifer sp.*嚴重時會造成貧血及死亡。

蛇類寄生蟲之常規檢查仍以鏡檢為主，少數文獻中提到可鏡檢伴隨糞便分子生物學檢查，而本次計畫中因蛇類寄生蟲種類眾多，故先以可能會感染給人的蛇類寄生蟲：隱孢子蟲、阿米巴原蟲及五口蟲為目標，建立聚合酶連鎖反應監測機制，檢測結果，65 例糞便檢體中含 4 例陽性案例，均來自於以飼養籠內發現相

對新鮮之糞便所採集之檢體，分別為 1 例隱孢子蟲 (1.5 %) 及 3 例五口蟲 (4.6 %)，所得結果比例不高，與參考文獻中的 2.4 % 相符(Rinaldi 等, 2012)；另有 3 例五口蟲的聚合酶連鎖反應有產物 (Fig. 24) 但因核酸序列比對無法完成 (lane 1) 或有雜 band (lane 3) 或 band 太微弱 (lane 7)，造成比對失敗，但仍建議疑似陽性案例需優先施打驅蟲藥降低風險。

整體而言，利用糞便檢體以分子生物學檢測寄生蟲之比例並不高，造成這樣的結果推測可能原因有：

1. 蟲卵或蟲體分布密度不均，雖可收集 1 – 2 g 的糞便，但利用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 時最多只可取約 180 – 200 mg 糞便，可能造成取樣失敗。
2. QIAamp DNA Stool Mini Kit 之使用是以哺乳類動物糞便為標的，此次用於蛇類糞便，其內容物主要是小鼠骨骸或毛髮之未消化物，經取樣後再經原因 1 之處理易增加取樣失敗。
3. 利用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 所取得之 genomic DNA 為腸內所有可能之生物 genomic DNA (含蛇及其腸道菌)，其 DNA 成份不單純可能相互干擾，造成後續聚合酶連鎖反應的失敗。

有關爬蟲類寄生蟲感染之臨床治療，線蟲類多數可使用藥物包含 Fenbendazole、Ivermectin、Levamisole、Metronidazole 等。其中 Fenbendazole 及 Metronidazole 之主要投予路徑為口服，Levamisole 主要投予路徑為皮下及腹腔注射，但其安全範圍小，需謹慎使用。Ivermectin 為唯一可供肌肉、皮下注射及

口服使用之線蟲驅蟲藥。原蟲類感染主要使用 Metronidazole，投藥方式為口服。而在吸蟲及條蟲部分，主要使用 praziquantel，投藥方式如同 Ivermectin 可以肌肉、皮下注射及口服方式給予。治療寄生蟲及原蟲感染均需重複給予藥物 2 週 (repeat 2 weeks)。五口蟲部分，目前無相對應之驅蟲藥可供使用。

有關投藥部分，因寄生蟲藥物投藥方式多以口服為主。對操作毒蛇而言，以口服為主之投藥方式易增加人員及動物受傷之風險，故通常選擇使用可採肌肉或皮下注射方式之藥物，如 Ivermectin 及 praziquantel，也因藥物使用之限制，應用於驅蟲計畫時有其局限性。

綜觀本次研究發現，毒蛇寄生蟲感染多數與現有文獻資料所記載之種類相符合，包含：線蟲、條蟲、五口蟲、吸蟲（蟲卵）等於本署圈養毒蛇均發現有程度不一之感染症狀，惟收集到的病例尚少，未來將長時間持續收集觀察各蟲種感染狀況。而糞便檢體檢驗部分，雖然文獻均將其視為常規檢驗，並將檢驗結果視為動物是否可脫離檢疫期之判定標準之一，但多數文獻檢出率不高，未來規劃於本署收容毒蛇檢疫期間（90 日）將糞便檢驗增為 3 次，期能增加檢出率，並確保驅蟲效果。分子生物學檢驗部分已建立 2 種原蟲及 1 種五口蟲之檢驗技術，因本研究檢出 2 種原蟲類均具有人畜共通傳染病之風險，故未來考慮將分子生物學檢驗納入常規檢驗中，維護人員健康。

綜上，本署規劃將視現有人力負荷及動物數量狀態，改善及調整檢疫期間運作模式，包含增加糞檢頻率，將原蟲類分子生物學檢驗納入常規檢驗，並增加抗寄生蟲藥物施打種類，以確保動物檢疫效果。

5. 參考文獻

1. 董光中、郭玉琴、王俊秀、賴政宏。台灣中部地區蛇類之五口蟲 (Pentastomids) 形態學研究。台灣獸醫誌 Taiwan Vet J 32 (4): 287-293, 2006.
2. 賴政宏、郭玉琴、董光中、王俊秀。台灣地區蛇類之寄生蟲調查。台灣獸醫誌 Taiwan Vet J 30(1): 26-32, 2004.
3. Frank P., Silvia B., An M., Nikola P. Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. The veterinary Journal 175, 53-68, 2008.
4. Haberfield J., Martelli P., Johnson R., Barten S., Gillett A., Lock B., Jones R., Simpson S., Jackson T. N. W., Cochran C., Dunstan N., Sunagar K., Fry B. G. (2015) Veterinary Care of Venomous Reptiles. In Venomous Reptiles & Their Toxins. New York, Oxford university press. pp 133-152.
5. Hawash Y. (2014) DNA Extraction from Protozoan Oocysts/Cysts in Feces for Diagnostic PCR. Korean J Parasitol 52:263-271
6. JEAN A. PARE, E. R. J. (2007) Parasites and Parasitic Diseases of Reptiles. In Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color atlas and text. Ed E. R. JACOBSON. New York, Taylor&Fancis Group. pp 571-666
7. Khairnar K, Parija SC. (2007) A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. BMC Microbiol 7:47-55
8. Rinaldi L, Capasso M, Mihalca AD, Cirillo R, Cringoli G, Cacciò S. (2012) prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from pet lizards and snakes in Italy. Parasite 19:437-440.
9. Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. (1997)

PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett 150: 209-217.

10. Tappe D, Meyer M, Oesterlein A, Jaye A, Frosch M, Schoen C, Pantchev N. (2011) Transmission of *Armillifer armillatus* Ova at Snake Farm, The Gambia, West Africa. Emerg Infect Dis 17:251–254.

6. 圖次



Fig. 1 線蟲卵，飽和浮游法，1000X 油鏡

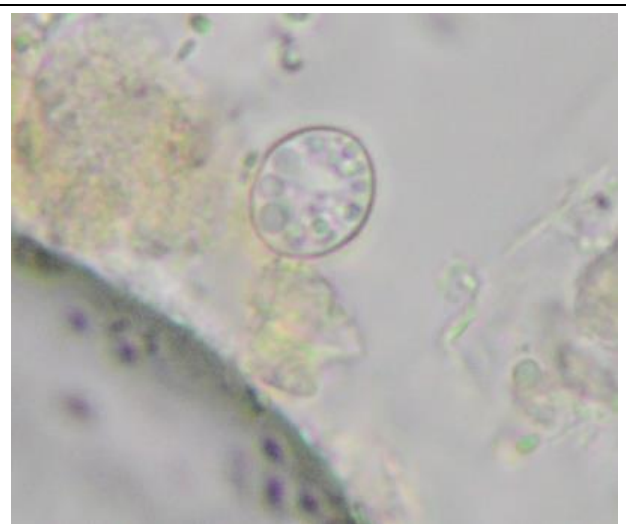


Fig. 2 線蟲卵，飽和浮游法，1000X 油鏡



Fig. 3 線蟲卵，飽和浮游法，1000X 油鏡

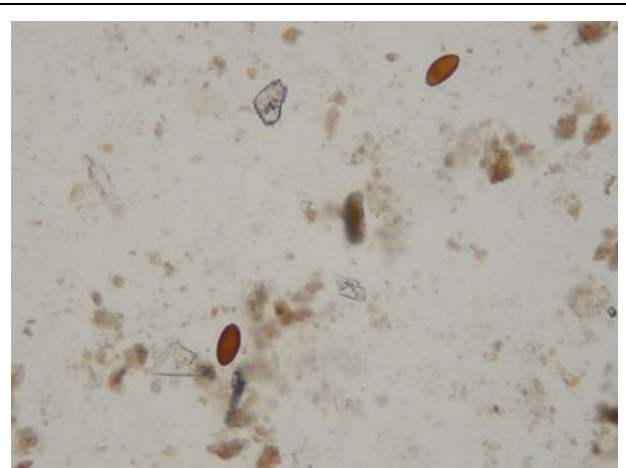


Fig. 4 吸蟲卵，離心沈澱法，1000X 油鏡



Fig. 5 吸蟲卵，離心沈澱法



Fig. 五口蟲卵，離心沈澱法，1000X 油鏡



Fig. 7 蛔蟲，可見寄生於腸壁漿膜面



Fig. 8 蛔蟲，可見寄生於腸壁漿膜面



Fig. 9 蛔蟲移行造成之肝臟損傷



Fig. 10 於百步蛇肺臟發現之五口蟲



Fig. 11 於龜殼花肺臟發現之五口蟲



Fig. 12 於龜殼花氣囊發現之五口蟲



Fig. 13 於小腸中下段發現之條蟲



Fig. 14 於肺臟發現之肺線蟲



Fig. 15 於肺臟發現之肺線蟲



Fig. 16 肺線蟲，解剖顯微鏡 2X



Fig. 17 於 12 指腸發現之消化道內線蟲



Fig. 18 於胃發現之消化道內線蟲

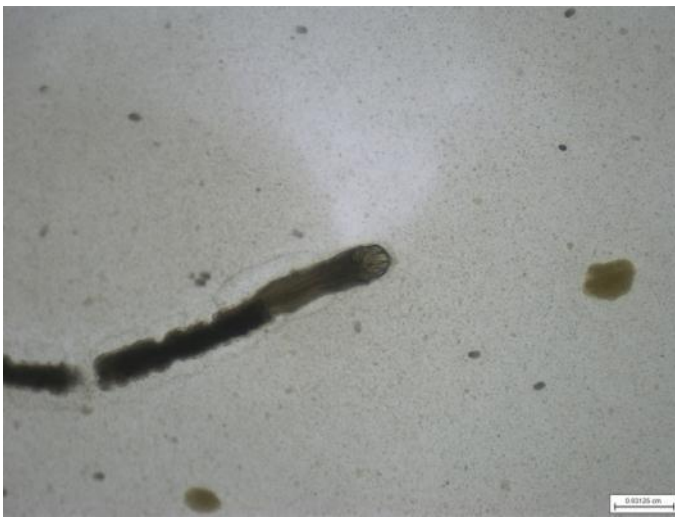


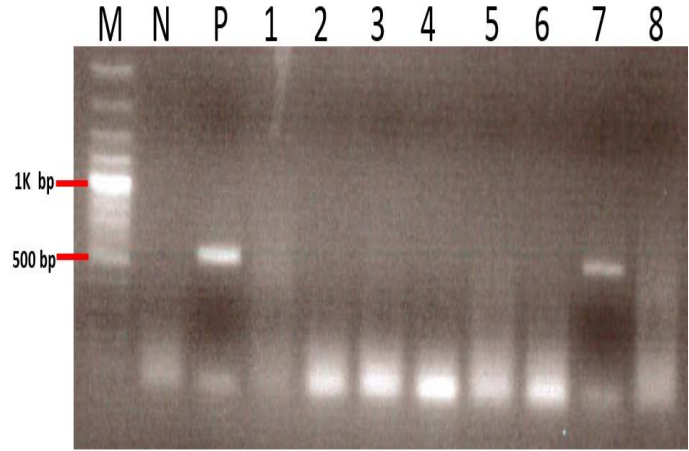
Fig. 19 消化道內線蟲，解剖顯微鏡 2X



Fig. 20. 消化道內線蟲，解剖顯微鏡 1X

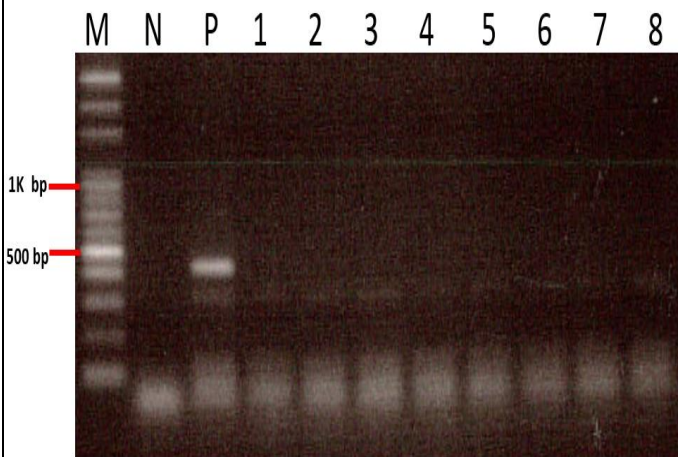


Fig. 21. 消化道內線蟲，解剖顯微鏡 4X



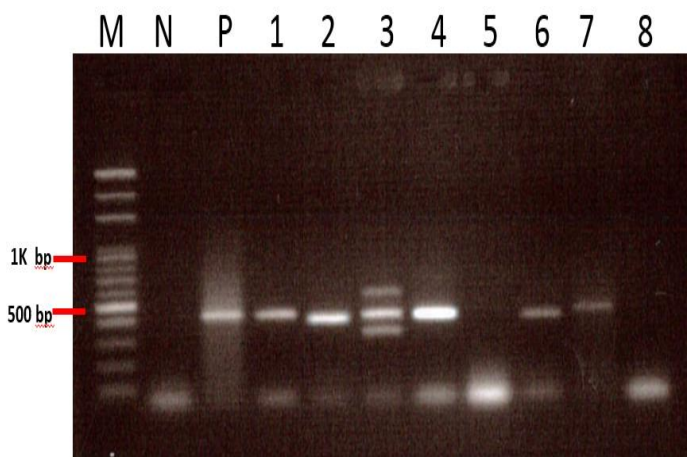
M:100bp marker N:negative control P:positive control

Fig. 22. 隱孢子蟲 COWP 基因片段放大 電泳圖



M:100bp marker N:negative control P:positive control

Fig. 23. 阿米巴原蟲 18S rRNA 基因片段放大 電泳圖



M:100bp marker N:negative control P:positive control

Fig. 24. 五口蟲 18S rRNA 基因片段放大 電泳圖