

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

研 究 報 告

EXPERIMENTAL REPORT OF
ANIMAL HEALTH RESEARCH INSTITUTE
NO.54

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

中華民國一〇九年十二月

PUBLISHED BY
ANIMAL HEALTH RESEARCH INSTITUTE
COUNCIL OF AGRICULTURE, EXECUTIVE YUAN
TAIWAN, REPUBLIC OF CHINA

December, 2020

第 54 期研究報告目錄

1. 綜論：氣候變遷與動物健康
李璠..... 1
2. 注射劑細菌內毒素試驗凝膠法評估
陳昱憲、林秋華、陳玉林、詹勳隆、林文華、葉修如..... 9
3. 白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測
陳怡彤、魯懿萍、涂堅..... 17
4. 走私肉製品及消毒毯之非洲豬瘟病毒監測
王羣、潘居祥、黃有良、張家宜、蔡國榮、洪鈴柱、鄧明中..... 27
5. 病例報告－石虎貓疥癬蟲感染症
陳彥彰、李敏旭、涂央昌、許偉誠、胡書佳、官南綾、吳建志、徐小晴、林桂賢、
詹芳澤、李璠..... 37

CONTENTS

1. Impacts of Climate Change on Animal Health F Lee.....	1
2. Injection Bacterial Endotoxin Test Evaluation (Gel-Clot Method) YH Chen, CH Lin, YL Chen, HL Chan, WH Lin, SR Yen.....	9
3. The surveillance of important pathogens in shrimp and environmental samples from hatchery and grow-out farm IW Chen, YP Lu, C Tu.....	17
4. African swine fever virus surveillance in confiscated meat products and disinfecting blankets samples from the border control authority in Taiwan C Wang, CH Pan, YL Huang, CY Chang, KJ Tsai, LC Hung, MC Deng.....	27
5. Case Report – Notoedric Mange (<i>Notoedres cati</i> Infestation) in a Free-ranging Leopard Cat (<i>Prionailurus bengalensis</i>) YW Chen, MS Lee, YC Tu, WC Hsu, SC Hu, NL Kuan, CC Wu, HC Hsu, GX Lin, FT Chan, F Lee.....	37

綜論：氣候變遷與動物健康

李璠*

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 氣候變遷是指地球氣候與天氣型態顯著且長期的變化，對地球環境造成的影響有許多不同的面向。氣候不同程度的改變，會導致生態與物種生活型態的改變，影響所及也包括人類與畜養的家畜禽。氣候變遷對動物健康的影響有直接及間接的影響，造成的影響也好壞互見。氣候變遷對動物的生理、免疫系統、對疾病的感受性都有直接的影響；間接的影響包括對寄生蟲、病媒與糧食作物產量的影響。氣候變遷對動物健康的影響涉及的因子很多，各種因子可能會相互影響或制衡，目前整體而言尚無定論，需要更長時間的研究。

關鍵字：氣候變遷、動物健康。

緒言

依據韋氏辭典的定義，「氣候變遷(climate change)」是指地球氣候與天氣型態顯著與長期的改變[1]。氣候變遷持續的時間，短則數十年，長則可達數百萬年。自從工業革命以後，人類的活動直接或間接地影響了地球的氣候，導致地表溫度逐漸上升，也就是所謂的「全球暖化(global warming)」。

氣候變遷對地球造成的影響有多種不同的面向，譬如冰河與海面冰層厚度、海平面高度、地表植被分布、開花結果時序、物種演化等。對生物而言，長期的氣候變遷會推動物種的演化以適應新的氣候環境；短時間的急遽氣候變化則可能導致部分物種的滅絕。都市化、生產經濟作物等土地利用方式的改變，都會損害生物多樣性[3]。

氣候變遷對於動物健康的影響，依其影響的方式，可以概略分為「直接」與「間接」兩個面向。氣候變遷對動物健康的直接影響主要源自於氣溫上升造成的熱緊迫，進而引發動物的代謝異常、免疫力下降、氧化壓力(oxidative stress)，甚至死亡；此外，由於劇烈氣候波動出現的強降雨、洪水、嚴重乾旱等災害，也是影響動物生存的外在因素。至於氣候變遷對動物

健康的間接影響，範圍包括環境因子對病原微生物存活與病媒生物的影響，乃至於對飼料供給、有效牧地面積、生態環境、經濟活動與對人類行為的改變[4]。本文即以這兩個面向為主軸，略述這些改變對經濟動物與畜牧產業造成的效應。

氣候變遷對動物健康的直接影響

氣候變遷最容易讓人感受到的徵象便是氣溫的變化。自1980年代至今，全球的平均溫度在四十年之間上升了約攝氏1度。依據2019年美國環境資訊中心(National Centers for Environmental Information)全球氣候報告，2019年是過去140年以來平均氣溫次高的年度，僅次於2016年。2019年陸地與海洋的均溫高於平均值攝氏0.95度[5]。除了平均氣溫上升之外，氣候的變化也反映在每年寒冷的天數減少、冬季變短、一年中雨量的分布改變[6]。

恆溫動物的體溫，顧名思義不易因外在環境溫度改變而發生變化。當環境溫度發生改變時，動物利用生理的調節機制維持體溫的恆定。恆溫動物因應環境溫度上升的方式，不外乎排汗、增加呼吸速率、降低採食量與改變行為[7,8]。這些生理上的變化，對於遭受熱緊迫(heat stress)的動物，僅能提供有限度且短

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

期的保護，長期處於高溫的環境中，將會引發動物的代謝異常、免疫力下降、氧化壓力，甚或導致死亡。

以反芻動物為例，代謝性酸中毒是牛隻的跛足(lameness)的主要原因之一，而熱緊迫正容易引發酸中毒。受到熱緊迫的牛隻，在每天氣溫較高時吃得少，然後在較涼快時大量進食，容易導致酸中毒，進而引發蹄葉炎[9]。動物在炎熱的時候吃得少但耗能多，入不敷出的結果便是體重減輕或是體脂肪逐漸耗損。特別是夏季期間的泌乳牛容易因而引發酮病[10]或脂肪肝(liver lipidosis) [11]，其原因都是能量攝取的失衡，而環境溫度過高往往是掩藏在背後的元兇。熱緊迫也影響牛的繁殖性能，高溫不利於公畜的精蟲生成，對母畜也有降低卵子品質、增加胚胎死亡率、降低受孕率等的負面影響[12]。對乳牛而言，高溫會導致泌乳量下降，而且對產乳量的的衝擊是長期性的，並不會因為氣溫下降而立刻回升，有時甚至整個泌乳期的產乳量都無法回升 [13]。熱緊迫對肉牛的影響，雖然不會像乳牛一樣立即反映在產量上，但高溫造成的不適會損及肉牛的動物福利，長期而言依然會影響牛肉的品質與產量[12]。

在山羊方面，熱緊迫會減少採食量、增加採食次數及時間、增加飲水量、減少排便及排尿次數、流涎、張口呼吸、嗜睡，嚴重時虛脫、抽搐甚至死亡。山羊在熱緊迫下，生長變得遲緩，產乳量會下降，免疫力與生殖能力也下降[1]。

相較於哺乳動物，禽類由於有羽毛被覆與缺乏汗腺，對於溫度的變化似乎更加敏感[14]。對雞隻來說，環境溫度上升時，熱緊迫對於雞隻的蛋殼品質、繁殖能力、免疫能力、臟器重量都有負面影響。更直接的數據顯示，慢性熱緊迫會降低肉雞的採食量達16.4%、降低體重32.6%、增加飼料轉換率(feed conversion ratio，飼料消耗重除以雞隻增重) 25.6% [15]，使得雞肉的蛋白質比率下降但脂肪的比率升高[16]；高溫影響呼吸速率，增加呼吸速率造成血液與肌肉的pH值上升。這些影響提高飼養成本且不利於雞肉品質。對蛋雞而言，熱緊迫可使雞蛋產量減少36.4%、雞蛋重量降低3.41%[17]，也會降低蛋殼厚度、增加破蛋率。

氧化壓力是因為體內自由基過量或抗氧化物質不足所造成的失衡現象，雖然其作用機制不像傳染病那般顯而易見，但被認為可能與肺炎或腸炎等疾病有關。牛隻在夏季的血清中抗氧化物質、胡蘿蔔素、維生素E的濃度比冬季低，顯示抗氧化物質在體內的含量與氣溫有關[4]。

高溫環境對動物健康的影響雖然與動物品種、年齡、暴露時間有關，但高溫環境是動物健康的不利因子，卻是普遍的事實。高溫使動物的免疫力下降，進而使動物容易受病原微生物感染，疫苗接種的效果也會降低；動物受到感染後，其繁殖性能、生長效率都會下降，還可能增加抗生素的使用，間接促使微生物抗藥性的問題雪上加霜。

高溫還可能導致動物的罹病率與死亡率升高。當體溫超過正常溫度3至4度時，可能造成動物中暑、暈眩、熱痙攣，最後造成器官衰竭。Vitali等學者對乳牛的研究指出，義大利中部的乳牛場，臨床性乳房炎(clinical mastitis)的罹患率以夏季最高，其次為春季[18]。熱浪來襲之後的數日內以及熱浪持續的時間較久時，乳牛的死亡率都會升高[19,20]。綿羊、豬、兔、家禽也都有因熱浪來襲而大量死亡的例子。溫度的變化對於水產養殖業的影響，可能比陸生動物更為顯著。水溫的上升直接侷限了養殖地點的選擇，也會增加對水生動物的熱緊迫、提高對疾病的感受性，並且影響病媒的分布[21]。

氣候變遷對動物健康的間接影響

就病原微生物的面向來看，新浮現或再浮現傳染病的發生，與氣候變遷也有潛在關係。然而，由於這種關係並非線性關係，產生的機轉頗為複雜，難以預測[22]。

以A型流行性感冒病毒基因的演化為例，雖然就長期趨勢而論，A型流行性感冒病毒M2蛋白基因的演化與全球氣溫的升高呈正相關，但卻無法建立兩者之間的因果關係[23]。關於家禽流行性感冒病毒，氣候變遷已知會影響候鳥的遷徙，而候鳥因氣候變遷而改變了遷徙時間或遷徙路徑的演化，也會牽動家禽流行性感冒病毒的散播與演化，但是由於觀察這些變化的時間還不夠長，科學家對於氣候變遷究竟是否會對家

禽流行性感冒病毒的演化有決定性的影響，目前仍持保留的態度[24]。

對於人畜共通傳染病而言，氣候變遷會改變疾病的盛行率與其分布區域。以印度為例，日本腦炎、利士曼原蟲病、萊姆病、鼠疫等蟲媒人畜共通傳染病以及霍亂、鉤端螺旋體病、E型肝炎、大腸桿菌症、布氏桿菌症、李斯特菌症，黴菌毒素中毒等經水或食物傳播的人畜共通傳染病有隨著全球暖化而增加或蔓延的趨勢[25]。臺灣跨越二十年的研究也顯示氣候改變與日本腦炎的盛行有關[26]。加拿大對食媒性細菌病原的研究顯示，彎曲桿菌(*Campylobacter* spp)污染肉品的機率也受氣候影響[27]。以炭疽病為例，利用2006年至2015年世界動物衛生組織通報病例及ProMED-mail電子監測系統的資訊進行分析，高緯度地區氣溫的持續升高，會使動物炭疽病病例出現的風險升高。導致炭疽病發生率升高的可能機制，包括：永凍層融解使因感染炭疽病死亡的動物屍體解凍後重新暴露、乾燥有利於炭疽菌孢子的散播、氣溫升高使動物免疫力下降等[28]。

氣候變遷呈現的環境變化不只是氣溫，其他氣候因子諸如風場、降雨模式、相對溼度也會產生變化。這些氣候因子的改變，也都會牽動著人類的經濟活動與動物的棲地，間接地影響了動物的健康與福祉。

放牧是許多國家豢養牛羊的方式，牧地的面積、牧草的品質，皆左右著牛羊的乳和肉產量，直接影響人類攝取之動物性蛋白來源。澳大利亞的研究指出，年平均雨量愈少、月間降雨量的差異愈大，動物族群規模也會萎縮[29]。氣候變遷對於畜牧產業的影響，還包括上游的飼料供應問題。洪災、乾旱、水質劣化，均會影響糧食作物的穩定供應，而玉米、黃豆等糧食作物正是飼料的主要原料，一旦這些作物的產量縮減，長期而言畜產品價格必然隨之牽動。

氣候變遷的另一個常見徵候是雨量的不均勻。強降雨造成的洪水，除了直接衝擊動物的棲地與牧地之外，將大量的動物排泄物沖刷到河川與用水系統，對於缺乏自來水系統等公共基礎建設的地區而言，病原微生物隨著排泄物進入人與動物的飲水系統，增加了傳染病散播的風險[25]。人類及其豢養的家畜因為乾

旱、颶風、洪水等天災而遷移居住地的行為，也會讓傳染病隨著人與動物的移動改變分布的版圖[30]。

高溫高濕的環境有利黴菌孳生，如果採收、乾燥與儲存糧食作物的過程沒有適當管控環境條件，黴菌產生的黴菌毒素也會對食入發黴食物動物的肝臟、腎臟、消化道黏膜、腦、生殖系統造成傷害，引起急性的疾病。即便是低濃度的黴菌毒素，長時間的暴露也會減緩幼齡動物的生長速度，降低免疫能力，使動物更容易受到感染。以麥角毒素中毒(ergotism)而言，加拿大的研究發現氣候變遷有利於穀物中麥角毒素的生成，在2011年的調查，加拿大西部出產的小麥，有多達20%可驗出不同含量的麥角毒素[31]，這種毒素均有害人類與動物的健康。

寄生蟲感染的盛行率也可能受到氣候的影響。以胃腸道寄生蟲為例，雖然它們影響禽畜健康的階段是它們寄生在動物消化道內的時期，但它們生活史中大部分的時間都是在家禽與家畜的體外，因此也會受到外在環境的影響。Rose [32]運用一個稱為「GLOWORM-FL」的軟體模擬捻轉血矛線蟲(*Haemonchus contortus*)、棕色胃蟲(*Teladorsagia circumcincta*)、奧斯特線蟲(*Ostertagia ostertagi*)等三種反芻獸寄生蟲因季節性氣溫變化而受到的影響。結果發現對於小型反芻獸來說，氣溫升高的時候有增加捻轉血矛線蟲和棕色胃蟲感染的可能。但是，對牛而言，氣溫升高對於讓奧斯特線蟲感染的可能性降低。這樣的結果顯示對寄生蟲感染而言，氣溫對寄生蟲感染造成的效應在不同宿主動物與寄生蟲之間並不一致，實際的影響端視宿主動物與寄生蟲種類而異。

家禽流行性感冒病毒的演化，與候鳥的移動關係密切。對於長途跋涉的候鳥而言，氣候因子當然是影響候鳥遷徙的重要因素之一。日本科學家透過分析日本宮崎縣可能傳播高病原性家禽流行性感冒病毒的十種「風險候鳥(risky birds)」與氣候因子的相關性，推論「最高日均溫(average daily maximum temperature)」、「全球平均日照(mean value of global solar radiation)」、「每日最大降雨量(maximum daily precipitation)」三項氣候因子與這些候鳥的遷徙具有相關性[33]。平均氣溫、雨量、日照這些氣候因子，

也會隨著氣候變遷改變，對於病毒的演化與分布，可能構成間接的影響。

蟲媒動物傳染病的散播與盛行，也與傳播媒介在自然界的族群及分布緊密相連。對於節肢動物病媒而言，氣候變遷帶來的暖化與分布不均的降雨，直覺上給人容易孳生蚊蚋、加速疾病傳播的印象；但是氣候的改變，對節肢動物的繁衍卻未必絕對有利。關於壁蝨，歐洲的研究顯示歐洲的主要三種病媒壁蝨 *Rhipicephalus sanguineus*、*Dermacentor reticulatus*、*Ixodes ricinus*，長期調查均顯示分布的區域向北、向東逐漸擴展[6]。降雨對於蚊的滋生來說是雙面刃；雨水固然可以提供潮濕積水的環境，使幼蟲孑孓能夠生長及蛹化，但是大量降雨也會沖刷已經存在於水域中的孑孓與蛹，對於蚊的族群繁衍是正面還是負面效應，端賴實際的情境而定[34]。高溫對於病媒昆蟲而言，未必是利多因子。Onyango等人[35]研究埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*)與白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)攜帶茲卡病毒(Zika virus)的能力時發現，在實驗室環境下飼養的斑蚊，環境溫度愈高，成蟲壽命、成蟲吸血的比率、攜帶病毒的能力三者均愈低。對於另一類雙翅目病媒昆蟲庫蠅 (*Culicoides* spp.)而言，它攜帶的藍舌病病毒 (bluetongue virus) 和施馬倫貝格病毒 (Schmallenberg virus)自1996年以後在二十餘年間造成西歐牛羊群相當大的損失，這些疫情也被認為與全球暖化有關[35]。英國科學家Wittmann等人[36]曾利用伊比利半島1931年至1960年與1961年至1990年的氣候資料進行模擬，在氣溫提高攝氏2度的假設下，暖化確實有利於庫蠅 (*Culicoides imicola*，藍舌病與非洲馬疫的病媒昆蟲)的棲地在西歐向高緯度區域擴展，也符合1990年代末期藍舌病在歐洲蔓延的實際疫情。

還有一個較不為畜牧獸醫領域關注的問題是自然界野生蜜蜂的存續。蜜蜂是自然界傳遞花粉的主要傳播者，對開花植物的繁衍後代、農作物的開花結實扮演關鍵性的角色。自1996年後，世界各大洲不同品種的蜜蜂在自然界中受到蜂房小甲蟲 (small hive beetle, *Aethina tumida*)的寄生，使蜜蜂族群的生存大受威脅。無奈氣候變遷造成土壤溫度及濕度的上升，

環境條件有利於蜂房小甲蟲幼蟲的蛹化，對蜜蜂而言是雪上加霜[37]。目前蜂房小甲蟲的危害面積仍持續增加，還找不到有效的控制對策。

氣候變遷因子的交互作用與制衡

雖然氣候變遷的諸般變化會對動物的健康產生前述的種種影響，但這些直接或間接的影響未必是彼此協同或加乘的；這些影響有時也會相互制衡，抵銷彼此影響的強度與方向。

譬如溫度雖然有利於寄生蟲與病媒節肢動物的繁衍，但溫度也會提高這些生物的死亡率、降低病媒的叮咬率[3]；溫度升高有助壁蝨的散播，但乾旱與洪災能暫時降低壁蝨的分布[38]。對於病原微生物的宿主動物而言，氣溫上升也會促使這些動物調整自己適應環境，甚至尋找不利於病原生存的環境。例如孔雀魚 (Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*)感染外寄生蟲 *Gyrodactylus turnbulli* 時，會游往水溫較高的環境 (39)。酪農業雖然被認為是產生溫室氣體的主要來源之一，但是酪農業本身也可能身兼加害者與受害者。Gauly等學者對中歐酪農業所做的綜合分析指出，氣候變遷對於酪農業的正反兩面影響都有。氣溫升高與大氣二氧化碳濃度上升有利於牧草生長，但強降雨和乾旱等極端氣候對牧地則會造成衝擊；氣溫升高會使牧草的莖葉比 (stem to leaf ratio) 和植物組織內細胞壁的占比升高，讓動物吃下後的消化率降低[40]。

結語

氣候變遷對動物疾病的影響，由於相關的因子繁多而且影響的機制錯綜複雜，大幅增加了研究與分析的困難度；有些疾病的趨勢雖然與氣候因子呈現正相關，但是兩者之間的因果關係卻未必能夠清楚地理出脈絡。在這樣的複雜性與不確定性之下，對特定疾病的預測自然難上加難，遑論透過人為的介入避免特定疫情的發生。然而，氣候變遷對疾病版圖與出現頻度的改變已然浮現，對人類與畜牧業的衝擊難以忽略。與其漫無邊際、缺乏科學依據的預測，不如著眼於當前可以努力的幾個面向：

一、持續改善灌溉、飲水、運輸等基礎建設，促進畜牧設施生物安全的強化與產業的升級。

二、持續監測傳染病的盛行與分布，及時發現問題並尋求對策。

三、透過國際及公私領域的合作，共同處理區域性的動物健康與環境議題。

參考文獻

1. 范耕榛、林義福。通風、飲水、飼糧營養，紓解山羊熱緊迫的可能作為。羊協一家親 81:14-15。2020。
2. Merriam-Webster.com Dictionary, <https://www.merriam-webster.com/dictionary/climate%20change>
3. Cable J, Barber I, Boag B, Ellison AR, Morgan ER, Murray K, Pascoe EL, Sait SM, Wilson AJ, Booth M. Global change, Parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Phil Trans R Soc B* 372:20160088. 2017.
4. Lacetera N. Impact of climate change on animal health and welfare. *Animal Frontiers* 9:26-31. 2019.
5. NOAA National Centers for Environmental Information, State of the Climate: Global Climate Report for Annual 2019, published online January 2020, retrieved on March 16, 2020 from <https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201913>.
6. Beugnet F, Chalvet-Monfray K. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36:559-566. 2013.
7. Godyn D, Herbut P, Angrecka S, Corrêa Vieira FM. Use of Different Cooling Methods in Pig Facilities to Alleviate the Effects of Heat Stress—A Review. *Animals* 10:1459. 2020.
8. Hill DL, Wall E. Weather influences feed intake and feed efficiency in a temperate climate. *Dairy Sci* 100:2240-2257. 2017.
9. Cook NB, Nordlund KV. The influence of the environment on dairy cow behavior, claw health and herd lameness dynamics. *Vet J* 179:360-369. 2009.
10. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. Body condition score, metabolic status and milk production of early lactating dairy cows exposed to warm environment. *Riv Agric Subtrop Tro* 90:43-55. 1996.
11. Basirico L, Bernabucci U, Morera P, Lacetera N, Nardone A. Gene expression and protein secretion of apolipoprotein B100 (ApoB100) in transition dairy cows under hot or thermoneutral environments. *Proc XVIII Congr Naz Ass Sci Prod Anim* 8:592-594. 2009.
12. Summer A, Lora I, Formaggioni P, Gottardo F. Impact of heat stress on milk and beef production. *Animal Frontiers* 9:39-46. 2019.
13. Ravagnolo O, Misztal I. Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Parameter Estimation. *J Dairy Sci* 83:2126-2130. 2000.
14. Loyau T, Berri C, Bedrani L, M'etayer-Coustard S, Praud C, Duclos MJ, Tesseraud S, Rideau N, Everaert N, Yahav S, Mignon-Grasteau S, Collin A. Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body composition of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. *J Anim Sci* 91:3674-3685. 2013.
15. Sohail MU, Hume ME, Byrd JA, Nisbet DJ, Ijaz A, Sohail A, Shabbir MZ, Rehman H. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poult Sci* 91:2235-2240. 2012.
16. Zhang ZY, Jia GQ, Zuo JJ, Zhang Y, Lei J, Ren L, Feng DY. Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poult Sci* 91:2931-2937. 2012.
17. Star L, Juul-Madsen HR, Decuyper E, Nieuwland MG, de Vries Reilingh G, van den Brand H, Kemp B, Parmentier HK. Effect of early life thermal conditioning and immune challenge on thermotolerance and humoral immune competence in adult laying hens. *Poult Sci* 88:2253-2261. 2009.

18. Vitali A, Bernabucci U, Nardone A, Lacetera N. Effect of season, month and temperature humidity index on the occurrence of clinical mastitis in dairy heifers. *Adv Anim Biosci* 7:250-252. 2016.
19. Vitali A, Segnalini M, Bertocchi L, Nardone A, Lacetera N. Seasonal pattern of mortality, and relationships of mortality and temperature-humidity index in dairy cows. *J Dairy Sci* 92:3781-3790. 2009.
20. Vitali A, Felici A, Esposito S, Bernabucci U, Bertocchi L, Maresca C, Nardone A, Lacetera N. The effect of heat waves on dairy cow mortality. *J Dairy Sci* 98:4572-4579. 2015.
21. Walker PJ, Winton JR. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Vet Res* 41:51. 2010.
22. Lake IR, Barker GC. Climate change, foodborne pathogens and illness in higher-income countries. *Curr Envir Health Rpt* 5:187-196. 2018
23. Yan SM, Wu G. Trends in global warming and evolution of matrix protein 2 family from influenza A virus. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 1: 272-279. 2009.
24. Gilbert M, Slingenbergh J, Xiao X. Climate change and avian influenza. *Rev Sci Tech* 27:459-466. 2008.
25. Singh BB, Sharma, R, Gill JPS, Aulakh RS, Banga HS. Climate, zoonoses and India. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 30:779-788. 2011.
26. Hsu SM, Yen AMF, Chen THH. The impact of climate on Japanese encephalitis. *Epidemiol Infect* 136:980-988. 2007.
27. Smith BA, Meadows S, Meyers R, Parmley EJ, Fazil A. Seasonality and zoonotic foodborne pathogens in Canada: relationships between climate and *Campylobacter*, *E. coli* and *Salmonella* in meat products. *Epidemiol Infect* 147:e190, 1-10. 2019.
28. Walsh MG, de Smalen AW, Mor SM. Climatic influence on anthrax suitability in warming northern latitudes. *Sci Report* 8:9296. 2018.
29. Godde C, Dizyee K, Ash A, Thornton P, Sloat L, Roura E, Henderson B, Herrero M. Climate change and variability impacts on grazing herds: insight from a system dynamics approach for semi-arid Australian rangelands. *Glob Change Biol* 25:3091-3109. 2019.
30. Greer A, Victoria NG, David F. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. *Can Med Assoc J* 178:715-722. 2008.
31. Coufal-Majewski S, Stanford K, McAllister T, Blakley B, McKinnon J, Chaves AV and Wang Y. Impacts of cereal ergot in food animal production. *Front Vet Sci* 3:15. 2016.
32. Rose H, Wang T, van Dijk J, Morgan ER. GLOWORM-FL: a simulation model of the effects of climate and climate change on the free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of ruminants. *Ecol Mod* 297:232- 245. 2015.
33. Arikawa G, Fujii Y, Abe M, Mai NT, Mitoma S, Notsu K, Nguyen HT, Elhanafy E, El Darous H, Kabali M, Norimine J, Sekiguchi S. Meteorological factors affecting the risk of transmission of HPAI in Miyazaki, Japan. *Vet Rec Open* 6:e000341. 2019.
34. Elbers ARW, Koenraadt CJM, Meiswinkel R. Mosquitos and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 34:123-137. 2015.
35. Onyango MG, Bialosuknia SM, Payne AF, Mathias N, Kuo L, Vigneron A, DeGennaro M, Ciota AT, Kramer LD. Increased temperature reduced vectorial capacity of *Aedes* mosquitos for Zika virus. *Emerg Microb Infect* 9:67-77. 2020.
36. Wittmann EJ, Mellor PS, Baylis M. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 20:731-740. 2001.
37. Cornelissen B, Neumann P, Schweiger O. Global warming promotes biological invasion of a honey bee pest. *Glob Change Biol* 25:3642-3655. 2019.
38. Semenza JC, Menne B. Climate change infectious diseases in Europe. *Lancet* 9:365-375. 2009.
39. Mohammed RS, Reynolds M, James J, Williams C, Mohammed A, Ramsubhag A, van Oosterhout C, Cable J. Getting into hot water:

- sick guppies frequent warmer thermal conditions. *Oecologia* 181:911-917. 2016.
40. Gauly M, Bollwein H, Breves G, Brugemann K, S. Danicke S, Das G, Demeler J, Hansen H, Isselstein J, König S, Loholter M, Martinsohn M, Meyer U, Potthoff M, Sanker C, Schroder B, Wrage N, Meibaum B, von Samson-Himmelstjerna G, Stinshoff H, Wrenzycki C. Future consequences and challenges for dairy cow production systems arising from climate change in Central Europe – a review. *Animal* 7:843-859. 2013.

Impacts of Climate Change on Animal Health

F Lee*

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture

Abstract Climate change is significant and long-lasting changes in the earth's climate and weather patterns. Climate change influences the earth's environment in a variety of ways. These changes, major or minor, further result in the changes in ecology and life style of enormous species on this planet, including human being and domestic animals. Affection of climate changes to animal health can be direct or indirect and also positive and negative. Direct affection influences physiological and immunological conditions and disease susceptibility of animals. Indirect affection may include parasites' and vector's behaviors and crop production. These affections can interact or even balance to each other. Therefore, how climate change influences animal health is a multifactorial issue and currently inconclusive. Long-term investigation is necessary and encouraged.

Keywords: *climate change, global warming, animal health.*

注射劑細菌內毒素試驗凝膠法評估

陳昱憲*、林秋華、陳玉林、詹勳隆、林文華、葉修如

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 本研究目的在於建立實驗室執行細菌內毒素試驗能力，並對國內市售動物用藥品注射劑產品進行調查，評估目前動物用藥品注射劑產品是否能符合細菌內毒素試驗之規範。試驗結果可做為主管機關修訂檢驗標準及推動之參考。期盼修訂「動物用藥品檢驗標準」後，能符合藥典規範及國際趨勢並縮小與人用藥品差距，藉此提升國內動物用注射劑品質。根據中華藥典通則 8003 細菌內毒素試驗各項規範：依序進行內毒素標準品連續稀釋、內毒素檢測試劑靈敏度核驗。未來若搭配適當製造藥廠教育訓練，修訂「動物用藥品檢驗標準」與中華藥典規範要求一致，可望與國際趨勢接軌。

關鍵字：注射劑，動物用藥品檢驗標準，中華藥典，細菌內毒素試驗

緒言

我國「動物用藥品檢驗標準」，早期因扶植國內動物用藥製造產業成長等時空背景因素下，對於注射劑檢驗項目要求並未完全依照藥典規範，省略部分試驗 [2]。在現今產業逐漸國際化下，業者客戶對象拓展至世界各國而不再侷限於國內市場時，現行「動物用藥品檢驗標準」對注射劑之要求與藥典比較下寬鬆許多。因此，「動物用藥品檢驗標準」勢必面臨修訂與現行藥典要求一致，使我國產品能符合國際普遍要求。

未來對於「動物用藥品檢驗標準」一般藥品注射劑部分檢驗項目，可能因順應國際動物保護概念，勢必移除現行藥典已無須執行之動物安全試驗 (safety test)，以降低實驗動物使用；但考量注射劑品質及動物使用上安全性，應回歸執行藥典注射劑要求之熱原試驗 (pyrogen test) 等項目 [1]。傳統熱原試驗以紐西蘭白兔作為實驗動物，量測試驗前後體溫變化作為判定通過試驗與否方法，對於現今動物保護意識已有所衝突。儘管免熱原試驗仍為藥典規範各式熱原檢測方法有所爭議之指定最終判定方法 [1, 7, 9, 11, 12]。但現今製藥業多以藥典規範之細菌內毒素試驗 (bacterial endotoxin test, BET) 作為傳統免熱原

試驗之替代方式。隨科技進步，藥典亦收錄利用組織培養方式之單核球活化試驗 (monocyte activation test, MAT) 作為替代傳統免熱原試驗之新方法 [9]，惟細菌內毒素試驗在人用藥製造業已運行多年，不考慮檢驗技術、成本及試劑取得等因素下，需於短時間內進行方法轉換亦非易事。動物用藥品若要與國際規範及方法接軌，推動應以普及度較廣的細菌內毒素試驗為初期目標。

內毒素是指革蘭氏陰性細菌細胞壁上的脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)，其結構會引起生物體免疫反應，如產生細胞激素 (cytokines) (如 IL1、IL6、IL8、TNF 等)、凝集反應活化、補體系統活化進而造成生物體發熱、低血糖、低血壓甚至瀰漫性血管內凝集血栓症、敗血性休克等嚴重症狀 [3, 4, 5]。細菌內毒素只有在細菌成長、分裂、死亡等細胞壁溶解狀況下才會被釋出，一旦無菌製劑製造設備或產品滋生細菌，破壞原先無菌狀態，則內毒素可能伴隨出現。細菌內毒素對熱穩定性極高，普通高溫高壓環境下仍能保持活性，須至 250 °C 以上乾熱處理方能使之不活化，一旦產生於製藥設備中，將造成系統性汙染需耗費大量人力物力方可清除。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

細菌內毒素試驗最早收錄於1980年之美國藥典20版 (USP20NF15)，迄今已逾40年，期間試驗方法及標準亦逐漸與其他各國際公定藥典如歐洲藥典、英國藥典或日本藥典等調合化 (harmonization)，對於本試驗檢測技術以及使用商用試劑確認已有公定方法及條件，已為趨於成熟及穩定技術。本試驗技術由最早運用以人工判讀的凝膠法 (gel-clot technique) 之定性/半定量試驗發展至由儀器判讀的光度定量法 (photometric quantitative techniques) 之定量試驗 (含濁度法 (turbidimetric technique) 及呈色法 (chromogenic technique))，可供不同目的及階段的檢驗需求。人用藥品製造業已執行本試驗多年，其檢測方式多以可定量之光度法為主；而動物用藥品製造產業未來若執行本試驗，考量建置成本及產業發展狀況，應自凝膠法開始起步為佳。本研究以建置動物用藥品國家檢驗單位執行細菌內毒素試驗凝膠法為目的，並同時在法規修訂前對現行市售動物用藥品注射劑進行細菌內毒素狀況進行調查，結果可做為未來修訂法規參考。

材料與方法

原理

利用鱗 (*Limulus polyphemus*) 之循環阿米巴變形細胞 (circulating amebocyte) 水性抽提液製成之 LAL (limulus amebocyte lysate) 試劑，與細菌內毒素結合可形成凝膠之特性，以已知濃度之內毒素標準品 (經適當連續稀釋) 及檢品原液或經適當稀釋之檢液，與已知靈敏度之 LAL 試劑同時作用相比對，以測定檢品內所含細菌內毒素含量是否超標。

實驗材料

內毒素標準品 (certified standard endotoxin, CSE)：商用內毒素2個廠牌 (C牌、E牌)、細菌內毒素檢驗法用水 (BET用水, LAL reagent water, LRW)、細菌內毒素檢驗試劑 (BET試劑, limulus amebocyte lysate, LAL)：商用試劑2個廠牌 (C牌、E牌)、無菌去熱原注射針筒 (5 mL)、硼矽玻璃材質反應管：10×75 mm、去熱原級 PS 塑膠材質稀釋管：13×100 mm, 15 mL、去熱原級微量吸管尖：200

μL、1000 μL。

儀器設備

移液管 (pipette)：200 μL、1000 μL，振盪器 (vortex)，37 °C 非循環式恆溫水浴槽或加熱設備。

內毒素標準品復溶及儲備溶液製備

取商用包裝細菌內毒素標準品並依原廠使用說明加入所需BET用水後，進行劇烈震盪均勻，並儲存於2-8 °C，於此保存條件下原廠建議可使用一個月，本實驗室自訂使用期限3週。

內毒素標準品連續稀釋

根據搭配之細菌內毒素檢驗試劑靈敏度 (λ) 對標準品進行連續稀釋，配製至2 λ、λ、0.5 λ、0.25 λ，兩種商用包裝廠牌連續稀釋如表1、二。

內毒素檢測試劑復溶

取商用包裝內毒素檢測試劑，依原廠使用說明加入所需毫升數之BET用水後，確認內容物溶解後待用。復溶之試劑於2-8 °C可保存24小時，超過開啟時間24小時者應丟棄。

內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗

每批內毒素檢測試劑使用前或當試驗條件改變而可能影響結果時，依照藥典規範皆需核驗其標誌靈敏度。取內毒素標準品依試劑靈敏度 (C牌：0.03 EU/mL；E牌：0.015 EU/mL) 連續稀釋配製至2 λ、λ、0.5 λ及0.25 λ之稀釋液並連同陰性對照組 (BET用水) 取100 μL加入無熱原玻璃試管中，再加入100 μL之內毒素檢測試劑，輕輕混合均勻，各濃度均進行四重複試驗。於37 ± 1 °C反應60 ± 2分鐘後，小心移出觀察。若最低濃度 (0.25 λ) 內毒素標準品溶液及陰性對照之四重複結果均呈陰性，則本試驗有效。幾何平均終點濃度必須介於LAL試劑標誌靈敏度0.5 λ至2 λ之間，則該批試劑之標誌靈敏度通過核驗。內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗配製及判定如表3。

干擾因子試驗 (抑制/增強性試驗)

本試驗針對個別產品執行，用以確認該產品選定

之試驗稀釋倍數是否適合產品特性而不至於產生偽陰性或偽陽性結果。依藥典規範，當注射劑產品不論原料、製程或試驗條件改變而可能影響試驗結果時，皆應重新進行干擾因子試驗。試驗方法同內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗：除檢品溶液執行4重複外，尚須進行檢品添加標準品連續稀釋組4重複、去熱原水添加標準品連續稀釋組4重複以及去熱原水組2重複（陰性對照組）。根據藥典規範，樣品稀釋倍數不得超過藥典規範所計算出最大有效稀釋度（maximum valid dilution, MVD）。若檢品溶液組及陰性對照組皆為陰性，且去熱原水添加標準品連續稀釋組符合檢測試劑標誌靈敏度，則試驗有效；檢品添加標準品連續稀釋組之內毒素幾何平均終點濃度必須介於LAL試劑標誌靈敏度0.5 λ至2 λ之間，代表該稀釋條件無干擾因子存在。干擾因子試驗配製及判定如表4。

限量試驗（定性試驗）

當產品稀釋倍數已決定且通過干擾因子試驗後，則可依規範做為產品例行性之成品檢驗規格，判斷各生產批次產品中內毒素是否超標。試驗方法同內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗，依檢品最適當但不超過最大有效稀釋度之稀釋倍數進行。限量試驗配製及判定如表5。

內毒素含量之計算

幾何平均終點濃度：用於計算陽性對照組、陽性檢品對照組等之幾何平均終點濃度，該值須介於0.5 λ~2 λ之間。

幾何平均終點濃度 (E) = $\text{antilog}(\Sigma e/f)$

E：各重複試管之陽性對照組或陽性檢品對照組之終點濃度，即最後凝集之濃度

e：終點濃度 (E) 之對數值

Σe ：各終點濃度對數值之總和

f：重複試驗數

判定標準

各反應管於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 反應 60 ± 2 分鐘後小心移出試管，緩緩倒轉 180° 後目視觀察凝膠狀態，試管內容物為穩固之凝膠體者為陽性 (+)，而形成凝膠體或凝膠體無法保持其凝固性者為陰性 (-)。取試管時

需減少不必要振動，否則易造成不當之陰性判定。當最低濃度 (0.25 λ) 內毒素標準品溶液及陰性對照組之重複結果均呈現陰性，則試驗有效，反之無效需重新進行試驗。

結果

本研究自106年度行政院農業委員會動植物防疫檢疫局主管科技計畫，建置實驗室依據中華藥典規則8003細菌內毒素試驗之執行能力，培訓實驗室操作人員能力符合藥典內各項要求規範：

內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗

依據藥典規範，各批次試劑於初次使用時須進行本項核驗工作，主要目的為確認試劑是否符合標示靈敏度；另一方面可用以確認操作人員手法是否純熟，本計畫中，以本項目作為人員反覆練習手法項目：根據藥典，本項目完整操作需於時間內完成配製20反應管（如表3），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘。操作結果如標準品序列稀釋、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求，方可進行至下一步干擾因子試驗及限量試驗之演練。

干擾因子試驗

產品稀釋倍數應由製造廠自行評估，目前法規尚未要求執行情況下，除輸入產品已有國外原廠規範內毒素限量值外，國內製造產品無相關資訊可參考。

本計畫中，以隨機樣品進行干擾因子試驗練習，以藥典規範最寬鬆條件即最大稀釋倍數 (MVD) 作為練習條件。根據藥典，030反應管（如表4），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘，對操作人員操作手法考驗較大。操作結果如標準品序列稀釋、樣品添加、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求。

限量試驗結果

相較於試劑靈敏度核驗及干擾因子試驗等先期評估工作，限量試驗作為產品未來例行性檢驗方法，相對簡單。根據藥典，本項目完整操作需於時間內完成配製8反應管（如表5），第一管至最後管進入加熱反應時間不得超過1分鐘，對於已可熟稔操作前兩項試

驗之操作者來說，較無太大難度。操作結果如標準品、樣品添加、陽性對照組及陰性對照組皆通過並符合重複性要求。

不同商用廠牌之內毒素檢測試劑差異性

本研究使用兩種不同廠牌商用包裝內毒素標準品及檢測試劑（C牌及E牌）進行相關試驗，不同廠牌之凝膠法商用檢測試劑，皆為同樣原理檢測細菌內毒素，配製處理上可能有部分差異。測試結果，兩廠牌試劑進行干擾因子試驗與限量試驗，結果相同，無顯著差異。

討論

執行細菌內毒素凝膠法試驗時，所需注意細節眾多，若忽略掉某些部分易造成偽陰性或偽陽性而使試驗結果不可信：（1）試驗場所儘量避免氣流之擾動，減少空氣中異物或其他足以影響試驗結果之物質逸入；（2）試驗反應之溫度要求 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下加熱 60 ± 2 分鐘，使用的加熱器（水浴槽或乾浴器）溫度調控精確度需被要求；（3）人員熟練度需藉由不斷練習操作，判讀時僅能以第一時間顛倒反應管所見結果進行判定，且需由相同人員觀察判定，所有判定需於1-2分鐘內完成。避免各試驗管反應加熱時間不一造成誤判；（4）所有耗材如微量分注器吸管、稀釋用試管、稀釋用水或玻璃反應管皆為去熱原等級，避免因背景值汙染而誤判；（5）若考量試驗成本，反應用玻璃管可清洗滅菌再重複使用，但因內毒素需以 250°C 高溫情況下方能破壞，需使用經過溫度確效之高溫烘箱，方能避免玻璃反應管在重複使用下，有殘留內毒素之情形。

對於國外或國內人用藥品來說，細菌內毒素試驗為已經發展純熟的試驗項目。對人用藥品而言，因前端開發階段技術性資料較為完備，對於人體對藥品耐受度等皆有明確的科學推算結果，即便藥典內無特定成分之內毒素限量值，也能依前述資料以公式推算出產品之內毒素限量值。細菌內毒素試驗在藥廠執行範圍涵蓋原料及成品：（1）原料部份：無菌原料及注射用水（含例行性水質監控）須依藥典規格執行；（2）成品部分，製劑處方已收錄至藥典者，可依藥典規範限量值制定；藥典未收錄之處方，可由廠商依藥典規

範之產品單位時間最大總投給劑量自行計算評估或委託具相關經驗單位協助，惟該類評估多為計算之理想值，是否能將產品內毒素控制於理想值內，仍依各製造廠環境及製藥設備條件等因素不同而異。

複方注射劑之主成分雖各自有不同藥典內毒素限量值規範。但產品之內毒素限量值應於藥廠研發階段評估制定，雖主成分有各自內毒素限量值，但因各成分於配方中比例不同，無法以單一成分內毒素限量值代表整體，因此可依藥典計算產品於試驗中最大稀釋倍數計算之公式，以單位時間最大總投給劑量計算該產品內毒素限量值，故最終僅有一個產品限值。

不同於人用藥品，動物用藥品之使用對象涵蓋多種別動物，依FDA Guidance [10]：若藥物主成分於藥典無規範限量值而需自行推估情況下，考量不同動物種別之劑量使用量及耐受度差異，推估產品限量值應以最嚴苛條件評估，即體型最小、單位體重耐受度最低或年幼動物之情況。我國目前無公告類似指引，相關資訊可做為業者評估產品限量值或主管機關查驗登記審查時參考。

在動物保護及實驗動物減量趨勢下，具爭議性之熱原試驗未來將逐漸被其他方法替代。所幸，動物用一般藥品過往並未要求執行熱原試驗，未來也不建議推廣。近年收錄至藥典之單核球活化試驗為替代熱原試驗新技術，雖檢測熱原範圍可涵蓋內毒素性汙染物及非內毒素汙染物，但檢驗成本相對高昂許多（如方法轉換、設備需求及操作技術），一般化學藥品製造廠較難以負擔作為例行性檢驗用途。本試驗多應用於特殊情況如產品具內源性致熱物質導致細菌內毒素試驗嚴重干擾且無法排除而需進行熱原試驗之產品，可見於人用藥品高單價之細胞治療或蛋白質製劑。目前所見輸入動物用注射劑規格，仍以細菌內毒素試驗為主，尚未見國外運用本檢驗技術應用於動物用藥品之情形。

一般來說，無菌製劑若能嚴格管控原料、製程中細菌汙染問題，則能有效降低細菌滋生或細菌內毒素超標所造成之不良發熱反應風險。因此，細菌內毒素試驗長期以來作為熱原試驗之替代方法，但本試驗原始意義在於檢測無菌產品自原料、包材及製程中設備

等是否曾經因細菌汙染而存在細菌內毒素，並非作為替代熱原試驗而存在。目前動物用藥品注射劑大多為利用注射用水製備之水性注射劑，且主成分多屬小分子藥物，如常用化學藥品或抗生素，以細菌內毒素試驗大多可有效檢測產品中細菌內毒素是否超標。單核球活化試驗雖可涵蓋細菌內毒素檢測範圍，但檢驗成本相對高昂許多，於動物用一般藥品推動執行細菌內毒素試驗初期，恐較難為業者優先採用。

未來動物用藥品檢驗標準擬加入細菌內毒素試驗項目，目的為要求業者能確認產線至產品之無菌性。作為國家動物用藥品檢驗單位在法規推動階段，除評估細菌內毒素更精確之定量檢驗技術外，亦可配合其他計畫輔導或訓練業者品管人員操作能力。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助(106農科-9.11.1-檢-B3)，特此致謝。

表 1、C 牌 CSE1000 EU/mL 包裝，連續稀釋配製。

CSE 濃度 (EU/mL)	1000	50	25	2.5	0.12	0.06 (2λ)	0.03 (λ)	0.015 (0.5λ)	0.0075 (0.25λ)
前一階吸取量	-	0.1 mL	1 mL	0.2mL	0.24 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
BET 用水	-	1.9 mL	1mL	1.8mL	4.76 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

表 2、E 牌 CSE20 EU/mL 包裝，連續稀釋配製。

CSE 濃度 (EU/mL)	20	2	0.6	0.06	0.03 (2λ)	0.015 (λ)	0.0075 (0.5λ)	0.00365 (0.25λ)
前一階吸取量	-	0.2 mL	0.6 mL	0.2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
BET 用水	-	1.8 mL	1.4 mL	1.8 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

表 3、C、E 廠牌內毒素檢測試劑標誌靈敏度核驗配製及判定。

溶液	CSE 終濃度	稀釋液	重複試驗數	判定通過標準
陽性對照組	2λ	BET 用水	4	全陽性
(檢測試劑添	λ	BET 用水	4	陽性 or 陰性
加內毒素標	0.5λ	BET 用水	4	陽性 or 陰性
準品)	0.25λ	BET 用水	4	全陰性
陰性對照組	—	BET 用水	4	全陰性

表 4、C、E 廠牌干擾因子試驗（抑制增強性試驗）配製及判定。

試液編號	內毒素濃度/添加 內毒素之溶液	稀釋液	稀釋倍數	最終內毒素 濃度	重複試驗數	判定通過標準
A	無/檢品溶液	—	—	—	4	全陰性
			1	2λ	4	全陽性
B	2λ/檢品溶液	檢品 溶液	2	1λ	4	陽性 or 陰性
			4	0.5λ	4	陽性 or 陰性
			8	0.25λ	4	全陰性
C	2λ/BET 用水	BET 用水	1	2λ	2	全陽性
			2	1λ	2	陽性 or 陰性
			4	0.5λ	2	陽性 or 陰性
			8	0.25λ	2	全陰性
D	無/BET 用水	—	—	—	2	全陰性

表 5、C、E 廠牌限量試驗配製及判定

試液編號	內毒素濃度/ 添加內毒之溶液	重複試驗數	判定通過標準
A	無/稀釋之檢品溶液	2	全陰性
B	2λ/稀釋之檢品溶液	2	全陽性
C	2λ/BET 用水	2	全陽性
D	無/BET 用水	2	全陰性

參考文獻

- 中華藥典編修委員會。中華藥典（第8版）。衛生福利部，臺北市。2016。
- 行政院農業委員會。動物用藥品檢驗標準。行政院農業委員會農防字第1081470943號令修正發布。2019。
- 邱清裕。內毒素特性與檢測方法之簡介。腎臟與透析，民國97年20卷3期。2008。
- 連淑華等。小型注射劑產品之發熱性物質檢驗。藥物食品檢驗局調查研究年報，24: 79-96。2006。
- 連淑華等。2006。大型輸注液之熱原試驗。藥物食品檢驗局調查研究年報，24: 97-109。2006。
- Associates of Cape Cod. (www.acciusa.com)
- British Pharmacopoeia Commissio. British Pharmacopoeia (BP2019). Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), London, U.K. 2019.
- Charles River Laboratories.(www.endosafe.com)
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. European Pharmacopoeia (EP10.0). European Directorate for the Quality of Medicines&HealthCare (EDQM) Council of Europe. France. 2019.
- Food and Drug Administration.Guidance for Industry. Pyrogen and Endotoxin Testing: Question and Answers. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. U.S.A. 2012.

注射劑細菌內毒素試驗凝膠法評估

11. The Minister of Health, Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia (JP17). The Minister of Health, Labour and Welfare. Japan. 2016. Pharmacopeia (USP42-NF37). The United States Pharmacopeia Convention Inc. Rockville, U.S.A. 2019.
12. The United States Pharmacopeia Convention. The United States

Injection Bacterial Endotoxin Test Evaluation (Gel-Clot Method)

YH Chen* , CH Lin, YL Chen, HL Chan, WH Lin, SR Yen

Animal Drugs Inspection Branch, National Institute for Animal Health, Council of Agriculture,
Executive Yuan

Abstract The purpose of this study was to establish national testing laboratory capacity to perform bacterial endotoxin test and to investigate commercially animal injection products. To make sure these products meet the specifications of the bacterial endotoxin test on pharmacopeia. The results can be used as a reference for the revision of the Test standards of veterinary drugs by the authority. It hoped that the revised test standard will meet the pharmacopoeia and international trends. And promote the quality of veterinary drugs and decrease the gaps from human. According to the General chapter 8003 (Bacterial Endotoxin Test) in Chinese Pharmacopeia requirement. In the future, with appropriate training for the manufactures, it is feasible to revise the Test standards of veterinary drugs with the same requirement as the Chinese Pharmacopoeia and follow international tend.

Keywords: *injection, test standards of veterinary drugs, Chinese Pharmacopoeia, bacteria endotoxin test.*

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測

陳怡玟*、魯懿萍、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為避免新興疾病對我國白蝦養殖產業造成危害，本所收集9場田間白蝦場其生產過程之蝦隻檢體及環境檢體(如生餌、水及土壤等)，監測世界動物衛生組織表列疾病及2種新興蝦類病原，包含白點病、傳染性皮下及造血組織壞死症、陶拉症病毒、黃頭病毒基因1型、傳染性肌肉壞死症病毒、壞死性肝胰腺炎、急性肝胰臟壞死症、對蝦肝胰腺微孢子蟲病、偷死病病毒，確認是否有病原存在，並據以輔導白蝦場改善其生物安全環境與防治疾病。共完成白蝦檢體724件次及環境檢體948件次檢測工作，其中檢出率最高為對蝦肝胰腺微孢子蟲病12.9% (215/1672)，其次為急性肝胰臟壞死症1.8% (30/1672)。統整各場於輔導過程中所遇到的問題，建議白蝦場需引入未帶病原之蝦隻進行養殖，養殖前場內環境需徹底清潔消毒，且養殖過程會加入池水的物質(包含餌料生物、水源、益生菌等)，需確認其未帶病原及弧菌。最後需確保養殖池不會被人員或動物汙染病原。

關鍵詞：白蝦、生物安全、新興疾病。

緒言

自1970年起，全球水生動物產業每約10年左右會發生不同新興疾病造成相關養殖產業的損失。而每種新興疾病的發生，從確定病原、建立診斷標準到建立疫區處置措施，如治療方法、疫苗研發使用到重新成為非疫區之認定等，均需經歷數年時間，對養殖產業的危害控制往往緩不濟急。所以，國際間現行的水生動物產業健康管理策略，從原本對各別疾病進行診斷治療，轉為提高養殖產業本身對於疾病預防控制的能力 [8]。

我國自60年代發展草蝦養殖相關技術後，開啟草蝦養殖產業20年的蓬勃發展。然而，1988年蝦類病毒性疾病，如白點病(white spot disease, WSD)等的出現，使得草蝦的年產量急遽下降，重創相關產業。因此，我國於1996年自夏威夷引進白蝦代替草蝦，由於白蝦成長速度較快，對白點病的抗病力較高，養殖效率更佳，進而興起我國白蝦養殖產業的熱潮[1]，但自2009年起，蝦類急性肝胰腺壞死綜合症(acute

hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)、對蝦肝胰腺微孢子蟲病(*Enteroctyozoon hepatopanei*, EHP) [7]等新興蝦類細菌性及真菌性疾病的發生，造成全球養殖白蝦的產量大幅下降。且近年來，我國鄰近國家陸續傳出新型蝦類病毒性疾病疫情發生，如偷死病病毒(covert mortality disease virus, CMDV) [11]、十足目虹彩病毒(decapod iridescent virus 1, DIV1) [6]等，這些新興蝦類疾病對我國養蝦產業均產生極大威脅。

本所於105年至108年間各縣市蝦類送檢病例中，曾檢出白點病、傳染性皮下及造血組織壞死症(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHN)、對蝦肝胰腺微孢子蟲病、急性肝胰臟壞死症、黃頭病(yellowhead disease, YHD)、陶拉症(taura syndrome, TS)、草蝦桿狀病毒病(Spherical baculovirus)及其他細菌性疾病。檢出率最高的疾病依序為傳染性皮下及造血組織壞死症(33%)、白點病(25%)及對蝦肝胰腺微孢子蟲病(19%)。自106年

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

起，已有三年不曾檢出陶拉症和草蝦桿狀病毒病，但也發現對蝦肝胰腺微孢子蟲病和急性肝胰臟壞死症等2種新型蝦類疾病。其中，對蝦肝胰腺微孢子蟲病可藉由蝦苗、生物餌料及水體等多種途徑感染蝦隻，需有能力維持高生物安全水準的養殖場才可避免本病發生。藉由監測對蝦肝胰腺微孢子蟲病於養殖場發生情形來輔導國內白蝦繁養業者提高養殖場生物安全能力，不僅可減少本病於我國發生率，亦可降低其他新興蝦類疾病入侵本國的機率。

材料與方法

檢體收集

自107年10月起至108年12月間，與2家白蝦繁殖場及7家白蝦養殖場配合，收集其生產過程蝦隻檢體及環境檢體(如生餌、水及土壤等)，繁殖場於種蝦繁殖期間，每兩個月對其生產的一批蝦苗及水體進行採樣，若繁殖場非一貫式飼養，則同批蝦苗於零日齡蝦苗、紅筋苗、黑殼苗出貨時各採樣一次;養殖場則於引入蝦苗時、養殖中期及上市前進行採樣。其餘環境檢體視現場情形進行採樣。

蝦隻乳劑製備

以滅菌後的剪刀採取200 mg蝦體(含鰓、甲殼、泳足、步足、肌肉及肝胰腺)，置入含滅菌鋼珠小離心管中後，注入0.7 mL的L15(細胞培養液)。將小離心管置入組織均質機中均質四次，每次13秒。均質後小離心管放入離心機內，以4500 rpm離心10秒鐘。

生餌乳劑製備

以滅菌後的剪刀採取約1g檢體置入滅菌後的研鉢中，檢體以鉢棒及玻璃砂研碎均勻，放入離心管，注入L-15至離心管中並加至10 mL的刻度。離心管放入離心機離心，以2000 rpm離心15分鐘。

水體濃縮

採500 mL水體(水源及養殖池水)以12,000 rpm離心20分鐘，再將上清液經0.2 μm超濾膜濃縮至5 mL，取離心後沉澱物0.2g及濃縮上清液萃取核酸做病原核酸檢驗。

核酸萃取

本試驗除土壤樣本以外，所有核酸均使用台灣圓點自動核酸萃取儀及台灣圓點核酸萃取套組並依其操作步驟進行。土壤樣本以FastDNA® SPIN kit for feces進行萃取。

分子生物學

本試驗針對世界動物衛生組織(Office international des épizooties, OIE)及亞太區水產聯盟(Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, NACA)列管的9種對蝦類病原進行檢測，其中白點病毒(WSDV)、傳染性皮下及造血組織壞死病毒(IHHNV)、陶拉症病毒(TSV)、黃頭病毒基因1型(YHV1)、傳染性肌肉壞死病毒(infectious myonecrosis virus, IMNV)、壞死性肝胰腺炎(necrotising hepatopancreatitis, NHP)、急性肝胰臟壞死症(AHPND)檢測方法依據OIE水生動物疾病檢測手冊(Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals)[9]。對蝦肝胰腺微孢子蟲病(EHP)[5]、偷死病毒(CMVN)[11]尚未列入OIE手冊，則以NACA公告之巢狀聚合酶鏈鎖反應[5][11]進行檢測。

結果

病例收集及病原核酸檢出結果

於107年10月起至108年12月期間，共收集9場田間白蝦場白蝦檢體724件次及環境檢體948件次，其中病原核酸檢出率最高為EHP 12.9% (215/1672)，其次為AHPND 1.8% (30/1672)，WSSV則有0.5% (8/1672)。此外，在沒有臨床症狀的檢體中亦有CMNV 0.8% (13/1672)、IMNV 0.3% (5/1672)及NHP 0.1% (1/1672)核酸檢出，其餘病原皆未檢測到，於種蝦繁殖場B場蝦苗加測十足目虹彩病毒結果均為陰性(檢驗結果未提供)。各場基本環境設施及生物安全條件如表1，包含養殖場類型、養殖池材質、空池消毒有無、原水消毒有無及人員管制有無等分類，各場檢驗次數及結果如圖1。

根據輔導養殖場改善生物安全條件前的各場原始狀況的檢驗數據中(表2)，可見9場白蝦場中有7場白

蝦檢體檢出EHP，1場在無臨床症狀蝦隻中檢出CMNV，3場於水體中檢出EHP，且此3場白蝦檢體也為EHP陽性。顯示白蝦養殖場最常見病原為EHP，且較可能因白蝦帶原而污染養殖場環境。

於輔導2場種蝦場過程中，A場為一貫式繁殖場，基本環境設施及生物安全條件佳，所有檢體檢驗結果均為陰性(檢驗結果未提供)。B場曾於零日齡蝦苗檢體檢出EHP，追蹤病原來自帶原豐年蝦生餌，輔導種蝦場將生餌以-40°C冷凍處理不活化病原後，重新飼養蝦苗檢驗結果為EHP陰性。另追蹤B場下游黑殼場蝦苗有不同病原核酸(WSSV、NHP、CMNV)檢出(檢驗結果未提供)，追蹤原因為黑殼苗飼養期程較短，故黑殼場會持續引進蝦苗，其來源多且品質不一，場內亦無明確分區規劃引入蝦苗順序，場內生物安全環境不易維持，建議黑殼場需慎選蝦苗來源，且每次引入蝦苗時場內需徹底消毒。

於輔導7場白蝦養殖場的過程中，共檢驗了13次蝦苗，其中7次蝦苗來源為A場及B場，檢驗結果均為陰性，6次為國外苗，2次檢出EHP(均為F場引入蝦苗)，1次檢出IMNV(H場引入蝦苗，蝦隻無臨床症狀)。各場輔導情形如下：

1.C場(表3)：第一批蝦子出清後，空場約半年再引入第二批蝦隻飼養，養殖過程中均無病原檢出。

2.D場(表4)：養殖過程中白蝦檢出EHP、AHPND，追蹤病原可能來自同場其他池引進未經檢驗的蝦苗(EHP、AHPND 陽性)。發病池清池消毒後，後續引入蝦苗仍於養殖一至兩個月後檢出EHP、AHPND，故畜主決定提前收成。追蹤該場池底材質消毒後仍可檢出EHP，檢視其消毒方式，發現該場消毒前未徹底清潔池底汙泥及浮游生物，建議改善其消毒流程。

3.E場(表5)：養殖過程中白蝦檢出EHP，畜主決定放棄此批蝦苗。追蹤病原可能來自其工作人員，本場工作人員於多飼養場區工作，其室外飼養場區曾檢出EHP，輔導該場加強工作人員操作時清潔消毒管理流程，之後養殖過程均無病原檢出。

4.F場(表6)：蝦苗引入時已檢出EHP，輔導該場於飼養過程中加強池底排汙，控制場內EHP病原量，養

殖過程EHP持續有檢出，但無其他病原檢出，最終順利收成。

5.G場(表7)：養殖過程中白蝦陸續檢出EHP、WSSV，並因感染WSSV而造成短期內大量死亡，其每批送檢養殖池水亦同時檢出EHP、WSSV，推測本場乃受病原汙染水源造成感染，建議該場於養成過程中新引入之水源仍需重視消毒處理。

6.H場(表8)：引入蝦苗時檢出IMNV(蝦隻無臨床症狀)，後續因養殖狀況不佳而停養。

7.I場(表9)：為魚蝦混養場，養殖過程均無病原檢出，惟放苗3池僅有1池有收成。

另外D、E、H場在培養益生菌過程均遭受弧菌汙染而引起因白蝦死亡，建議須慎選益生菌原料及培養容器之清潔消毒。

討論

綜觀本研究之檢驗數據可見EHP為我國現行養殖白蝦主要病原，並可藉由蝦苗、生物餌料及水體等多種途徑感染感染蝦隻，其防治建議如下：引入未帶病原之種蝦/蝦苗、引入水源須經沉澱、過濾、消毒等處理流程、養殖場需管制人員進出、養殖場於空場期間場內須徹底消毒[3,4]。定期監測本病原可檢視白蝦場生物安全漏洞，並據以輔導業者改善其飼養環境之生物安全條件。

白蝦繁殖場多為室內養殖，較易達成上述基本生物安全條件，但因為出貨頻率較高，故需做好飼養區域規劃，避免新引入之蝦隻攜帶病原或出貨時蝦販機械性攜帶病原而汙染清境場區[2]。另，因種蝦需較高能量以生產蝦苗，故繁殖場可能會餵飼餌料生物，而不同於商用飼料之生產製程可破壞病原之傳染性，餌料生物需經檢測未帶特定病原或透過冷凍處理破壞其病原傳染性[7]，才可確保繁殖場持續生產出無特定病原之蝦苗。

白蝦養殖場雖然硬體設施較難改善，但可透過改善生產管理環節來達到近似的生物安全效果，如延長空場時間達成空池消毒(C場)或添購機械設備過濾水源達成原水消毒(F場)等。生物安全也不只在於硬體設施的建立，更在於養殖場實際執行情形，如D、E場雖

有門禁可限制外來人員進出，但工作人員於其他場地工作後，未經清潔消毒又進入管制區域，故仍可能機械性攜帶其他場地病原進入該場。反之，F場雖無門禁可限制外來人員進出，但因地處偏遠鮮有外人出現，工作人員也僅在該場工作，故由人員機械性攜帶病原而造成感染的風險極低。從G場的資料也可知引入乾淨蝦苗只是養成無特定病原白蝦的第一步驟，養殖過程中引入未經消毒的池水，往往是現場疾病感染的主要原因，追溯該場發生白點病之前，其周邊地區已有白點病病例發生，該場極可能因此引入受病原污染的水源而感染白點病毒。我國目前大部分水生動物養殖場在有疫病發生需清場時，往往未做消毒處理就直接放流其養殖場水生動物，進而造成區域性的疾病爆發，故改變水生動物養殖農戶對病弱動物的處置觀念，是提升我國水生動物養殖產業的生物安全條件相當重要的一環。另外，在未做任何生物安全設施的魚蝦混養場，雖於養殖過程中無病原檢出，但實際僅收成三分之一，可能是因其選擇的混養魚種(石斑)捕食性較強，故蝦隻養殖效率不彰，或因病蝦易被魚隻捕食故池中病原易被清除。有關魚蝦混養場的養殖環境條件尚待進一步研究。

另外D、E、H場在養殖中期均有蝦隻大量死亡的情形，檢測其死亡蝦隻並無病原檢出，但蝦隻臟器可分離到弧菌，至現場追蹤發生原因時，D場提供之無標示之益生菌原料未長出市面上一般常見之益生菌種，其擴培容器盛裝之清水則養出大量弧菌。H場提供之

室外擴培(未加蓋)之益生菌液於實驗室培養後，可見弧菌為其優勢菌種。E場提供之益生菌液及原料培養狀況均正常，現場管理人員後續檢查其養殖池壁破損情形，推測未消毒之水源流入養殖池，添加益生菌液後反而造成水源的弧菌過量繁殖。綜合上述經驗，養殖過程如需使用益生菌，需做好原料之品質管理，並避免擴培液造成弧菌增長，反而使弧菌成為養殖池的優勢菌種。

養蝦成功的關鍵在於白蝦場整體對於生物安全觀念的建立與執行。引入帶病原蝦苗入場後，病原無法因養殖技術消失，更可能污染原本清淨的環境，部分病原如EHP雖可透過加強池底排污等措施維持蝦群健康，但養殖過程需耗費較大心力去維持蝦池中病原濃度，故養殖前需慎選蝦苗來源，確認飼養蝦隻未帶病原。其次需確保每批蝦苗飼養前池底無病原殘留，建議使用可確實清潔消毒之池底材質，若無法改變池底材質則要落實翻土及曬池流程[1,10]，並維持較長的養殖池的飼養空窗期。在養殖過程中，需控管養殖過程進入池水的物質未帶病原或含過量弧菌，這些物質包含餌料生物、水源、益生菌等。建議養殖過程中新引入之池水均需經過濾消毒之程序，避免周邊養殖場的病原透過水源污染環境。最後，養殖場需做好人員管制，避免工作人員、外來訪客或動物等機械性攜帶病原造成清淨場域被污染。綜合上述資料，彙整白蝦繁養殖場所需注意生物安全條件如圖2。

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測

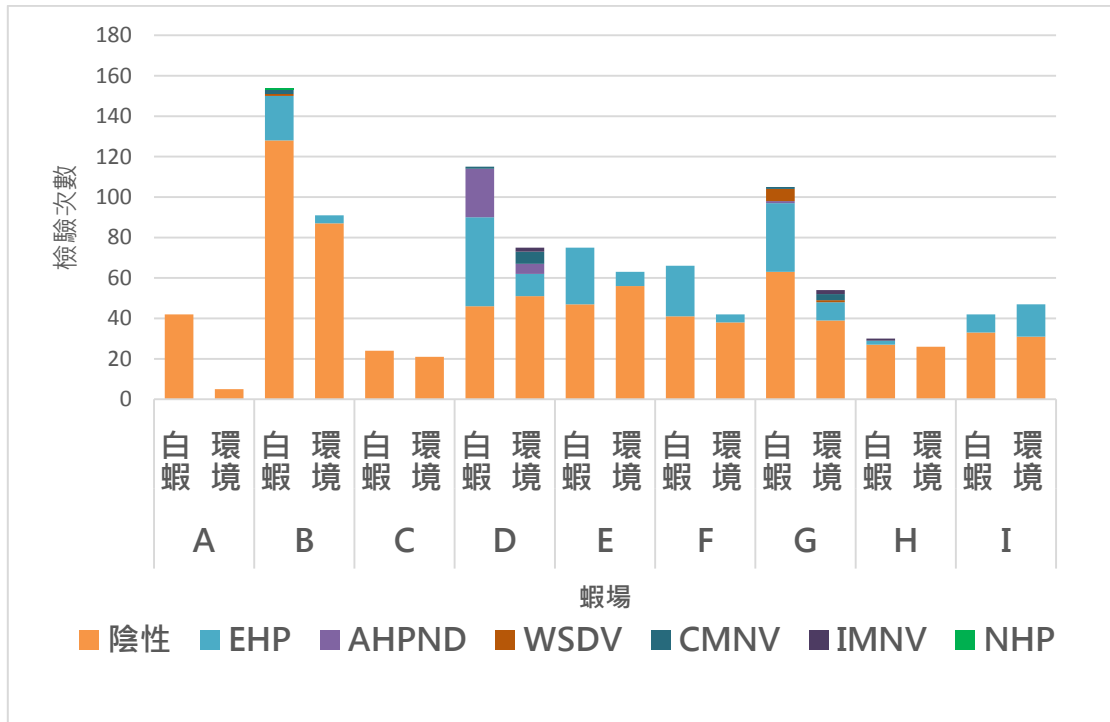


圖 1、9 場白蝦場各別檢驗次數及結果。

SPF蝦

- 入場前檢驗引入種蝦、蝦苗未帶病原
- 防止場內交叉汙染-統進統出、養殖場分區規劃

環境消毒及添加物管理

- 空場徹底清潔後再行消毒
- 原水經沉澱、過濾、消毒等處理後再引入池內
- 餌料生物、益生菌管理

出入管制

- 人員進出管制及清潔消毒
- 預防動物機械性傳染

圖 2、白蝦場生物安全建議。

白蝦場生產過程蝦隻及環境檢體監測

表 3、C 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	—	—	泰國
第一批進苗	—	—	B 場
第一批養成中期	—	—	

表 4、D 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體, 底泥檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP,CMNV	多來源
第一批進苗	—	—	A 場
第一批養成中期	蝦子有死亡情形, 送檢為弧菌		
第二批進苗	—	—	A 場
第二批養成中期	EHP	AHPND,IMNV,CMNV	
第二批收成	EHP,AHPND	AHPND,CMNV	
第三批進苗	—	EHP*,CMNV	A 場
第三批養成中期	EHP	AHPND,CMNV	

*為底泥檢驗

表 5、E 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	國內 SIS 二代苗
第一批進苗	—	—	A 場
第一批養成中期	蝦子有死亡情形, 送檢為弧菌		
第二批進苗	—	—	B 場
第二批養成中期	EHP	EHP	
第三批進苗	—	—	B 場
第三批養成中期	—	—	

表 6、F 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP	泰國
第一批進苗	EHP	—	泰國
第一批養成中期	EHP	—	
第一批收成	EHP	—	
第二批進苗	EHP	—	泰國
第二批養成中期	EHP	EHP	
第二批收成	EHP	—	

表 7、G 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	EHP	泰國
第一批進苗	—	—	泰國
第一批養成中期	EHP,WSDV	EHP,WSDV	
第一批收成	EHP	EHP,IMNV,CMNV*	
第二批進苗	EHP	—	泰國
第二批養成中期	EHP,AHPND,CMNV*	EHP	
第二批收成	EHP	—	

*後續追蹤採樣無病原檢出，無法追蹤來源

表 8、H 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	越南
第一批進苗	IMNV	—,弧菌量高	越南
第一批養成中期	蝦子養殖狀況不佳,清池		
第二批進苗	—	—	泰國

表 9、I 場採樣資料及檢驗結果

採樣時期	白蝦檢驗結果	水體檢驗結果	蝦苗來源
輔導前	EHP	—	多來源
第一批進苗	—	—	B 場
第一批養成中期	—	—	
第一批收成	—	—	

參考文獻

1. 陳弘成。白蝦養殖要點。養殖漁業經營管理手冊技術篇。陳秀男(編)。漁業署養殖特刊第 5 號 39-41 頁。行政院農業委員會漁業署。2001。
2. 財團法人台灣養殖發展基金會。外銷觀賞水生動物養殖場及中轉場登錄管理作業要點宣導手冊。財團法人台灣養殖發展基金會。台北市。2017。
3. Aldama-Cano DJ, Sanguanrut P, Munkongwongsiri N, Ibarra-Gómez JC, Itsathitphaisarn O, Vanichviriyakit R, Flegel TW, Sritunyalucksana K, and Thitamadee S. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). 2018. *Aquaculture*, 490, 156-61. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.039
4. de la Peña LD, Somga J and Baliao D. Biosecurity in aquaculture: Philippines. 2018. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/static/news/MultistakeholderConsultation/Item7.pdf>
5. Itsathitphaisarn O, Jaroenlak P, Sanguanrut P, Salachan PV, Wiredu-Boakye D, Williams BAP, Stantiford GD, Flegel TW and Sritunyalucksana K. A new and improved PCR detection method for *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) based on a gene encoding a spore wall protein. 2016. Retrieved from <https://enaca.org/?id=115&title=new-pcr-detection-method-for-enterocytozoon-hepatopenaei>
6. NACA, Disease advisory: decapod iridescent virus 1 (DIV1): an emerging threat to the shrimp industry. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1098&title=decapod-iridescent-virus-1-an-emerging-threat-to-the-shrimp-industry>
7. NACA, Fact sheet on *Enterocytozoon hepatopenaei*, a microsporidian parasite of shrimp. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1064&title=fact-sheet-on-enterocytozoon-hepatopenaei-a-microsporidian-parasite-of-shrimp>
8. NACA, Report of the eighteenth meeting of the ASIA regional advisory group on aquatic animal health. Retrieved from <https://enaca.org/?id=1094&title=report-of-the-18th-regional-advisory-group-on-aquatic-animal-health>
9. OIE , Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2019. Retrieved from <https://www.oie.int/en/standard-setting/aquatic-manual/accessonline/>
10. OIE, Methods for disinfection of aquaculture establishments 2009. Retrieved from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/ahm/2009/1.1.3_DISINFECTION.pdf
11. Zhang Q, Liu Q, Liu S, Yang H, Liu S, Zhu L, Yang B, Jin J, Ding L, Wang X, Liang Y, Wang Q and Huang J. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *J. Gen. Virol.* 95: 2700-9. 2014.

The surveillance of important pathogens in shrimp and environmental samples from hatchery and grow-out farm

IW Chen^{*}, YP Lu, C Tu

Animal Health Research institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract To prevent new emerging diseases cause damage in the white shrimp aquaculture industry, the surveillance of OIE list diseases and 2 new emerging diseases, including white spot disease virus (WSD), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), taura syndrome virus (TSV), yellowhead disease virus (YHDV), infectious myonecrosis virus (IMNV), necrotising hepatopancreatitis (NHP), acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), *Enteroctozoon hepatopanei* (EHP) and covert mortality disease virus (CMDV), of shrimp in hatcheries and grow-out farms, and associated environmental factors(larvae, raw feed, pond water and soil) were executed. After having analyzing the results of the investigation, we next aimed to assist shrimp farmers to improve the biosecurity management and diseases prevention of their farms. Totally, we had tested 724 shrimp and 948 environmental samples. The highest detection rate of above samples was 12.9% (215/1672) for EHP, followed by 1.8% (30/1672) for AHPND. According to the problems of farms encountered in this project, we suggest that the most important of building biosecurity for shrimp farms is the introduction of specific pathogen free (SPE) shrimp larvae to farms. Next, the shrimp pond should be cleaned and disinfected thoroughly before stocking seed; then, the material (food organisms, water and probiotics) should be free from the vibriosis contamination. Finally, biosecurity should be enforced to prevent irrelative people and animals from entering farms.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, biosecurity, emerging disease.

走私肉製品及消毒毯之非洲豬瘟病毒監測

王羣*、潘居祥、黃有良、張家宜、蔡國榮、洪鈴柱、鄧明中

*行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 目前非洲豬瘟(African swine fever; ASF)尚無疫苗可供使用，豬隻，包括家豬及野豬是唯一被非洲豬瘟病毒感染的動物，死亡率可達100%。台灣屬於海島型國家，防範非洲豬瘟主要為邊境防控，然而目前從疫區入境旅客仍能查獲違法攜帶生鮮或未煮熟肉品，這類行為對我國防疫工作造成極大威脅。因此，阻絕從疫區違規攜入或主動棄置之肉製品，並對該肉製品以及各機場與港口旅客入境消毒毯進行非洲豬瘟病毒檢驗，避免該病毒入侵我國養豬產業，實屬刻不容緩工作。由2018年8月至2020年6月，共採集肉製品3,146件，消毒毯拭子1,282件。檢測結果顯示248件肉製品經檢測呈現陽性反應，其中189件來自中國，59件來自越南；消毒毯拭子檢測結果則均為陰性。在基因序列檢測，所有陽性檢體皆屬第二基因型之病毒株(Genotype II)，而病毒分離結果皆為陰性。上述監測結果顯示，從疫區違規攜入或主動棄置之肉製品，仍可檢出非洲豬瘟病毒核酸，顯見經由違規肉製品入境，有可能將非洲豬瘟病毒帶入國內。

關鍵詞：非洲豬瘟、走私肉製品、消毒毯。

緒言

非洲豬瘟病毒(African swine fever virus ; ASFV)只會感染豬隻，包括各品系家豬及野豬，進而導致豬隻發病死亡[1,11]。非洲豬瘟病毒亦可在軟蜱(*Ornithodoros* ticks)體內增殖及複製，若感染非洲豬瘟病毒之軟蜱叮咬健康豬隻(tick-borne transmission)，將會造成豬隻感染該病毒[1,9,10]。非洲豬瘟病毒具封套，呈20面體的大型雙股DNA病毒[2,7]，屬於Asfaviroidae病毒科Asfivirus屬，也是目前該科的唯一成員[1,2,5,6]。病毒顆粒直徑大小約200nm，病毒結構相當複雜，至少存在54種結構蛋白質，依據該病毒p72結構蛋白質之B646L基因序列相似性進行比對以及血清學分析，目前非洲豬瘟病毒至少可分為23種基因型及8種血清型。非洲豬瘟病毒基因體包含一個保留中心區(conserved central region，長度約125 kb)，以及由二個變異端(variable ends)轉譯之

五個多基因區域(multigene families ; MGFs)，導致不同非洲豬瘟病毒株之基因體序列長度有所差異，包含約170至193 kb的基因體長度等[1, 11]。部分MGFs基因序列被認為與非洲豬瘟病毒株之毒力，以及ASFV病毒於軟蜱中的複製與增殖能力有關。部分MGFs基因的缺失(deletion)會降低非洲豬瘟病毒於軟蜱中複製和增殖效率[4,10]。MGFs基因在非洲豬瘟病毒抗原性的變異產生(generate antigenic variability)，以及如何逃避宿主免疫反應(evade host immune response)，進而逃避宿主免疫細胞的清除有相當關連性，但是確切機制仍須進一步深入研究。該病毒主要感染宿主單核細胞和巨噬細胞，並在細胞質中進行複製，並於內質網進行病毒結構蛋白增殖和組裝。因為非洲豬瘟病毒基因類型多，且逃避宿主免疫機制複雜多樣，可逃避宿主免疫細胞的清除。現階段已研製的非洲豬瘟疫苗，雖然能誘導產生一定力價的

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

抗體，但這些抗體並不具備中和非洲豬瘟病毒的能力，亦即疫苗誘發的抗體無法有效中和非洲豬瘟病毒的感染[7,10]。

非洲豬瘟病毒入侵養豬場後，約13-19天後才會有臨床上的異常而被發現[3,5,8]。其傳播通常由發病欄內互相感染，之後逐步往鄰近欄與對面欄擴散，之後再到整棟豬舍。非洲豬瘟病毒感染可呈現多種症狀，由超急性、急性、慢性至無症狀的帶毒者皆有[3,5,8]。其中若感染強毒株病毒，將造成100% 豬隻死亡。而感染中間毒株病毒，豬隻出現急性臨床症狀，但有高比例感染豬隻存活。若是豬隻感染弱毒株病毒，則無明顯臨床症狀，但血清可檢測出非洲豬瘟抗體(REF???)。在臨床症狀方面，發病豬隻出現發高熱、精神沉鬱、食慾廢絕、嘔吐、下痢(甚至出現鮮紅色血痢)、四肢末端及耳翼皮膚呈現發紺、懷孕母豬流死產。剖檢可見豬隻脾臟極度腫大、質弱易脆，肺出血及出現間質性肺炎病變；下顎淋巴結、腸繫膜淋巴結出血以及扁桃腺明顯出血及切面呈大理石樣病變，胃漿膜面瀰漫性出血，腎臟腫脹明顯以及皮質有出血點或出血斑[3,5,8,12,13]。

自2018年8月3日中國遼寧省爆發非洲豬瘟後，疫情迅速擴散，短時間之內中國各省區均淪為非洲豬瘟疫區。而蒙古、越南、柬埔寨、北韓、寮國、緬甸、菲律賓、韓國及印度等國亦先後均淪為非洲豬瘟疫區。亞洲各國非洲豬瘟病毒流行株均屬第二基因型，與俄羅斯和東歐目前流行的 Georgia 2007病毒株屬於同一演化分支，均屬於強毒株[13]。該病毒若侵入我國養豬場，將瓦解現有國內的豬肉生產體系，造成豬肉供需失調，價格飛漲，且連帶豬肉生產體系相關產業也將崩解，並造成極大經濟損失。然而目前仍有返國或入境旅客查獲違法攜帶生鮮或未煮熟肉品，對我國防疫工作造成極大威脅。因此除阻絕違法攜帶之肉製品入境，並須針對該肉製品及各機場與港口旅客入境消毒毯進行非洲豬瘟病毒核酸檢驗，以完成阻絕非洲豬瘟病毒入侵我國養豬場。

材料與方法

肉類製品及消毒毯拭子

自2018年8月至2020年6月由本所及國內六所非洲豬瘟初篩實驗室(2019年10月開始運作)，包括台灣大學獸醫專業學院、中興大學獸醫學院、嘉義大學獸醫學院、成功大學醫學院、屏東科技大學獸醫學院以及財團法人農業科技研究所設之非洲豬瘟初篩實驗室，針對來自中國大陸(含香港、澳門)、越南、柬埔寨、緬甸、寮國、泰國、北韓、韓國、俄羅斯、菲律賓及、新加坡、馬來西亞、印尼及汶萊等國家來臺之入境旅客違規攜入或主動棄置之肉類製品，共計3,142件進行非洲豬瘟病毒核酸檢驗。各初篩實驗室陽性檢測結果之病材，將送至本所進行複驗。另外，防檢局各分局在其海關的旅客進出口設置消毒毯，並定期採樣及送至本所檢驗，共計1,282件消毒毯拭子。

病毒核酸萃取

取0.5-1.0g肉製品，加入5-10 ml Modified Eagle Medium (MEM)，以組織研磨機進行研磨，製備成樣品懸浮液。經1000g離心5分鐘，取出200 μ l，加入等量的BL2試劑，使用MagPurix Virus Nucleic Acid Extraction Kit以自動核酸萃取儀萃取病毒核酸。而有關消毒毯拭子處理，加入0.5 ml MEM並充分混和，取出250 μ l至ependoff，並加入等量的BL2試劑，再以MagPurix Virus Nucleic Acid Extraction Kit及自動核酸萃取儀萃取病毒核酸。所萃取之核酸樣品立即進行檢測或保存於-70°C冰櫃中備用。

引子(primers)及探針(probe)設計及定量聚合酶鏈反應(Quantitative polymerase chain reaction; qPCR)：

應用定量聚合酶鏈反應技術(Quantitative polymerase chain reaction; qPCR)[1,2]，引子及探針序列之設計係依據OIE (World Organization for Animal Health) 推薦非洲豬瘟病毒特异性引子對(pair of primer) (表1)。qPCR採單一步反應(One-step reaction)，所需試劑加在同支反應管內，反應液配製如表2。每次進行反應時，加入ASF質體陽性對照組以及陰性對照組，並與實驗組同時進行。反應完成後，電腦分析軟體即自動統計並繪製擴增曲線圖(amplification curve)，以擴增曲線圖進行判讀。陽性

檢體的判讀標準為：該檢體在最後一個循環數(cycles numbers)的閾值(Ct)小於 40，則將該檢體判定為陽性檢體，反之，若該檢體的 Ct 值大於 40，則判定為陰性。

巢式聚合酶鏈反應(nested polymerase chain reaction; nested-PCR)

前述之肉製品及消毒毯等樣品若經qPCR檢測為陽性，則以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction; PCR)以及巢式聚合酶鏈反應(nested polymerase chain reaction; nested-PCR)進行複驗，其引子對設計主要參考OIE(World Organization for Animal Health)與其他參考文獻推薦非洲豬瘟病毒特異性引子對[1, 2, 9]，共設計出3組nested-PCR引子序列(表3)，將所需試劑加在同一支反應管內，反應液配製如表四。第一組72DF/72UR(PCR產物478 bp)進行第一次PCR後再以FOR3/REV2(PCR產物250 bp)進行nested-PCR；第二組PPA outer 2F/PPA outer1R(PCR產物520 bp)進行第一次PCR後再以PPA-1/PPA-2進行nested-PCR(PCR產物257 bp)；第三組CVR1/CVR2 (PCR產物665 bp)進行第一次PCR後再以ORF9L/ORF9R(PCR產物178~392 bp)進行nested-PCR。第一組PCR(72DF/72UR)反應條件為：50°C 2分鐘(1循環)→95°C 10分鐘(1循環)；95°C 15秒→60°C 60秒(40循環)。而nested-PCR(FOR3/REV2)反應條件為：95°C 3分鐘(1循環)；95°C 15秒→58°C 15秒→72°C 15秒(40循環)→72°C 7分鐘。第二組PCR(PPA outer 2F/PPA outer1R)反應條件為：95°C 3分鐘(1循環)；95°C 15秒→55°C 20秒→72°C 25秒(40循環)→72°C 10分鐘。而nested-PCR(PPA-1/PPA-2)反應條件為：95°C 3分鐘(1循環)；95°C 15秒→62°C 30秒→72°C 30秒(40循環)→72°C 7分鐘。第三組PCR(CVR1/CVR2)反應條件為：95°C 3分鐘(1循環)；95°C 30秒→55°C 1分鐘→72°C 1分鐘(40循環)→72°C 10分鐘。而nested-PCR(ORF9L/ORF9R)反應條件為：95°C 3分鐘(1循環)；95°C 1分鐘→55°C 1分鐘→68°C 1分鐘(40循環)→68°C 10分鐘。每次進行反應時，

係同時進行前述三組PCR/nested-PCR反應與結果判讀，並加入非洲豬瘟質體陽性對照組以及陰性對照組，與實驗組同時進行。反應完成之產物取10 µl於2% Agarose進行電泳分析，電泳完畢後浸泡於EtBr中染色，並於紫外線下觀察反應產生之條帶後照像及判讀。

核酸定序及比對

經由nested-PCR增幅之陽性核酸產物，進行後續非洲豬瘟病毒P72基因序列之定序與比對。主要利用ABI PRISM 3730XL Automated Fluorescent DNA sequencer 進行DNA分析定序。其是以ABI Big Dye™ V3.1 Cycle sequencing kit進行，原理為利用ddNTP上帶有四種不同吸光波長的螢光劑以dideoxynucleotide termination的方式及PCR的方法進行試管內DNA合成。加入十分之一體積的3M NaOAc及2.5倍體積98%酒精，於冰上作用10分鐘，離心倒掉上清液，加入5 µl loading dye，經6% polyacrylamide gel分析，以sequencer detector上雷射光束激發螢光的訊號，黑色代表鳥嘌呤核苷酸(guanine nucleotide)，綠色代表腺嘌呤核苷酸(adenosine nucleotide)，紅色代表胸腺嘧啶核苷酸(thymidine nucleotide)，藍色代表胞嘧啶核苷酸(cytidine nucleotide)。完成定序之非洲豬瘟病毒P72基因序列將與世界各國歷年登錄於美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information; NCBI)之非洲豬瘟病毒P72序列進行比對。

病毒分離

前述之肉製品及消毒毯等樣品若經qPCR檢測為陽性，則進一步進行病毒分離。將豬隻巨噬細胞培養於24孔盤內，待完全貼附或隔天方可接種病材。每孔加入100 µl 乳劑後，於37°C 5% CO₂ 培養箱內培養18小時。然後加入100 µl之0.75%紅血球(7.5 µl + 1ml PBS) 並培養18小時，並觀察是否有紅血球吸附現象(Haemadsorption; HAD)。若發現HAD後，取100 µl 細胞懸浮液冷凍解凍，進行核酸檢測確認。若未發現HAD的樣品，則將細胞培養盤冷凍解凍後，取100 µl 加入新的巨噬細胞內，並重

複上述步驟，培養至第3代確認無HAD方可判定陰性。

結果

應用qPCR以快速檢出肉類製品之非洲豬瘟病毒核酸，並以nested-PCR及定序進行確診。結果顯示3,142件肉類製品中，非洲豬瘟陽性者共計248件，陽性率為7.89%。其中中國大陸189件(圖1)，越南59件(圖2)。在2019年7月時，來自中國大陸肉製品的陽性率甚至可達20.58%(28件)，2019年8月至11月之間，來自中國大陸肉製品陽性率均維持在10%以上，顯見中國大陸非洲豬瘟疫情仍十分嚴峻。2020年3月開始，因受新型冠狀病毒肺炎疫情影響，出入境旅客大幅減少，截至2020年6月，來自中國大陸肉製品的陽性件數僅檢出5件。此外，2019年6月至2020年3月，來自越南肉製品的陽性率均維持在10%以上，其中在2019年10月及12月，其肉製品陽性率甚至可達50%以上，可能受到新型冠狀病毒肺炎疫情影響以及出入境旅客大幅減少之故，2020年4月至6月來自越南的肉製品均未檢出陽性。

檢出之189件中國大陸非洲豬瘟病毒核酸陽性肉製品，主要以香腸(20%)及豬肉脯(20%)為最大宗，其次為豬肉(包含生豬肉10%)、豬肉乾(9%)以及紅腸(8%)等肉類加工製品。而檢出之59件越南非洲豬瘟病毒核酸陽性肉製品，則以豬肉包(30%)及火腿(17%)之數量最多，其次為火腿麵包(14%)及含豬肉法國麵包(11%)。另外送檢之1,282件消毒毯拭子，檢測結果均為陰性。

所有非洲豬瘟病毒陽性肉製品，其P72基因核酸序列經定序及比對分析，與中國大陸及俄國2007喬治亞病毒株(Georgia 2007; ASFV-G)達99%以上之相似性，皆屬於第二基因型之病毒株(Genotype II)。另外在病毒分離部分，則均為陰性，並未分離到病毒株。

討論

非洲豬瘟病毒跨境傳播可能的主要管道是旅客違

規攜帶疫區豬肉製品入境，尤其是中國大陸及越南的香腸、豬肉脯及火腿等豬肉產品，其傳播疫病的風險極高。正當全球關注新型冠狀病毒肺炎疫情發展，仍須注意我國周邊鄰國非洲豬瘟疫情依舊險峻。2020年亞洲地區包含中國大陸、越南、韓國、印尼、緬甸及菲律賓等國家向世界動物衛生組織(OIE)通報發生新的非洲豬瘟案例，並新增印度為非洲豬瘟疫情爆發國家。除了韓國僅發生野豬案例外，其他國家則是持續通報發生家豬案例，顯示國際非洲豬瘟疫情沒有降溫，疫病侵入我國的風險仍高。雖然相關單位對於非洲豬瘟防檢疫宣導工作持續進行，加上近來進出境旅客人數因受新型冠狀病毒肺炎疫情影響持續下降，但我國既有的邊境管制並沒有因此鬆懈，仍維持高強度執法方式，手提及託運行李以X光機查驗，並搭配檢疫犬嗅聞，以期有效防堵非洲豬瘟於國門第一線。

為防範非洲豬瘟疫情入侵，泰國亦加強邊境管制措施，由2018年至2019年間共查獲4010件各式走私肉製品[14]，其中非洲豬瘟陽性者共計343件，陽性率為8.55%，相較於我國7.89之陽性率，二國之間檢測結果相當類似。而非洲豬瘟病毒陽性肉製品，其P72基因核酸序列經定序及比對分析，亦與中國大陸病毒株及俄國2007喬治亞病毒株(Georgia 2007; ASFV-G)達99%以上之相似性，屬於第二基因型之病毒株(Genotype II)，亦與我國分析比對之結果完全相符。

非洲豬瘟病毒可以藉由病豬的血液、體液直接地傳播給其它豬隻，或是透過病豬製成食物或遭病豬血液等污染的器具間接地傳播給其它豬隻[3, 6]。非洲豬瘟病毒存活力強，可存活於酸鹼值4-13。室溫下，在糞便可中存活11天。沒有洗乾淨的豬舍、豬欄至少可存活1個月，染血的木板上至少可存活70天、腐敗的血液中可存活超過105天以上、冷藏豬肉存活100天，甚至可在冷凍豬肉存活達1,000天[3, 6]。非洲豬瘟病毒於加工肉製品中有機會存活，並經多種方式接觸病毒而傳染，包含高溫蒸煮不足的廚餘/感染豬分泌物、排泄物/車輛運輸/人員衣具攜帶/未高溫烹煮的肉類製品/軟蜱(Ornithodoros)叮咬等[3, 6, 10]。因此若由疫區攜入豬肉和肉鬆製品，且其製程中若加

走私肉製品及消毒毯之非洲豬瘟病毒監測

熱溫度不足，並將其作為廚餘餵飼豬隻，就有極高傳播病毒的風險。因非洲豬瘟病毒感染沒有任何藥物或疫苗可與預防，一旦感染豬隻，死亡率可達百分之百。另外，因病毒對環境抵抗力極強，不容易殺滅，一旦國內有疫情，陽性場全面撲殺，將造成豬價高漲及豬肉無法外銷，且短時間內恐怕難以清除，需要花費多年才能恢復清淨。

臺灣養豬產業已達成「非施打疫苗之口蹄疫非疫區」之新里程碑，然而境外非洲豬瘟病毒若不幸傳播至臺灣，除了每年豬肉產值將蒙受重大損失，多年來數十億的口蹄疫防疫成本與努力也將功虧一簣，連帶影響各個相關產業，甚至影響民生生計。因此必須持續建構與強化非洲豬瘟檢診體系，同時整備國內非洲豬瘟應變措施與資源，有效阻絕非洲豬瘟於境外。我

國於中國爆發第一例非洲豬瘟時，就高度的重視該疫情並督導其相關機關建立防疫、檢疫及病原檢驗等系統，提升硬體及軟體設備，健全法令以因應非洲豬瘟災害及防止該病入侵和引入風險。為此，除依據OIE陸生動物診斷試驗及疫苗手冊(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.8.1.)，建立非洲豬瘟等相關診斷技術，亦不斷增進其檢驗流程及診斷結果的時效、正確性與品質。另外，也結合國內5所大專院校醫學與獸醫科系及農業科技研究院資源，建立非洲豬瘟初篩實驗室，有效擴大診斷量能。期望未來能有效防堵境外非洲豬瘟及其他海外惡性傳染病入侵我國，保障我國畜產事業之永續經營。

中國大陸豬肉產品檢測陽性案例百分比圖

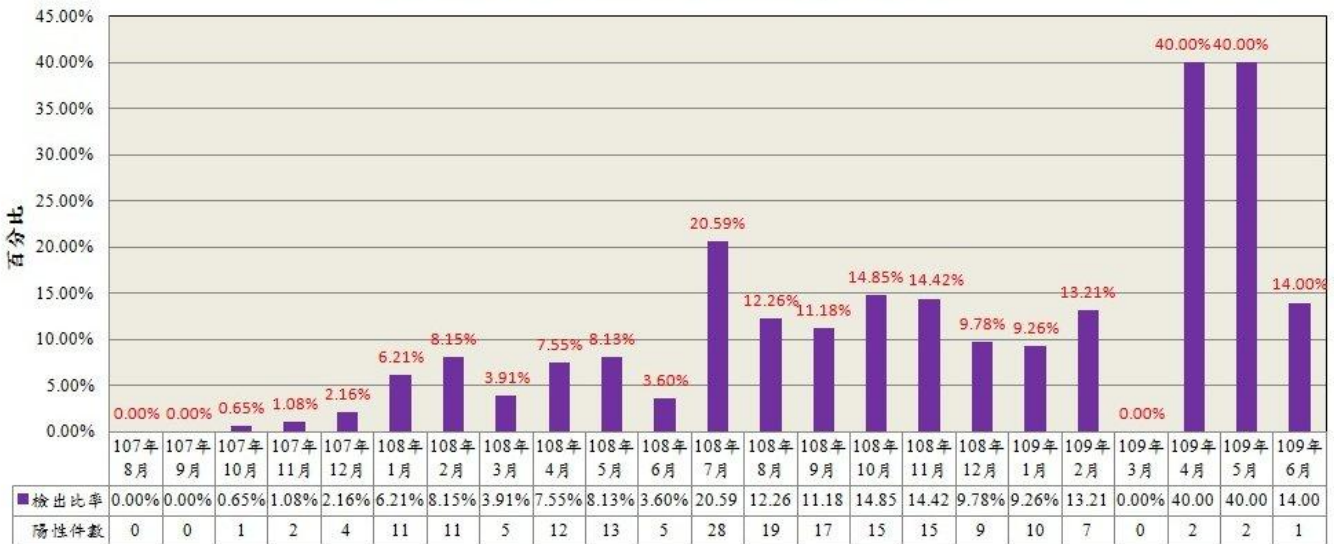


圖 1、107 年 8 月至 109 年 6 月，共計檢出 189 件非洲豬瘟病毒陽性之中國大陸豬肉類製品。

越南豬肉產品檢測陽性案例百分比圖

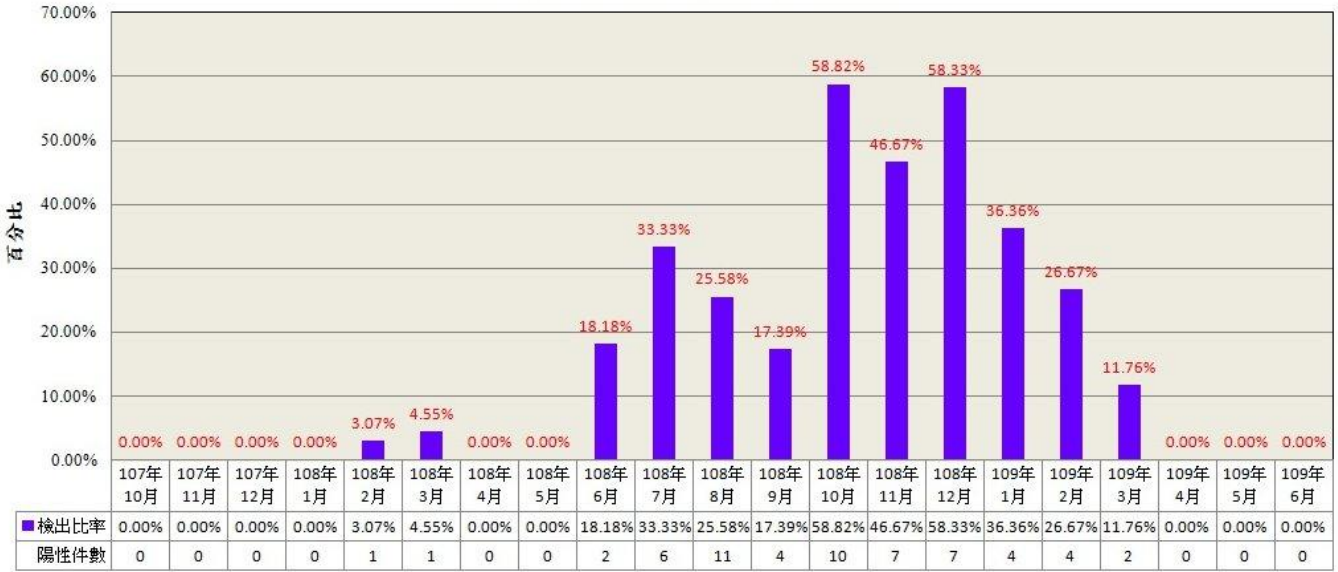


圖 2、107 年 10 月至 109 年 6 月，共計檢出 59 件非洲豬瘟病毒陽性之越南豬肉類製品。

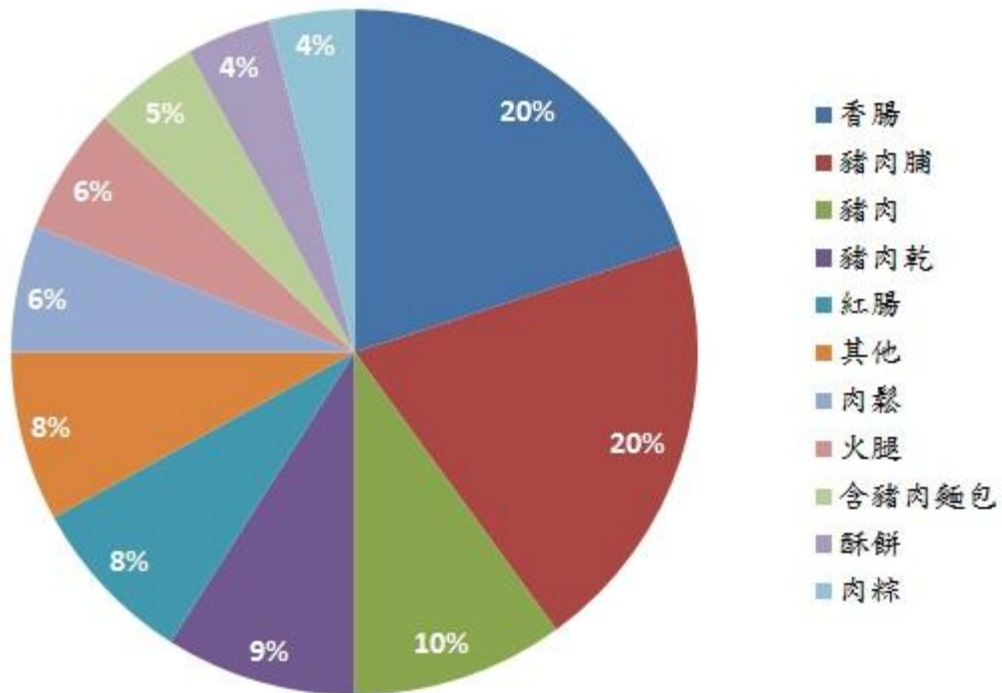


圖 3、檢出之中國大陸 189 件非洲豬瘟病毒陽性豬肉類製品當中，以香腸(20%)及豬肉脯(20%)之數量最多，其次為豬肉(10%)及豬肉乾(9%)。

走私肉製品及消毒毯之非洲豬瘟病毒監測

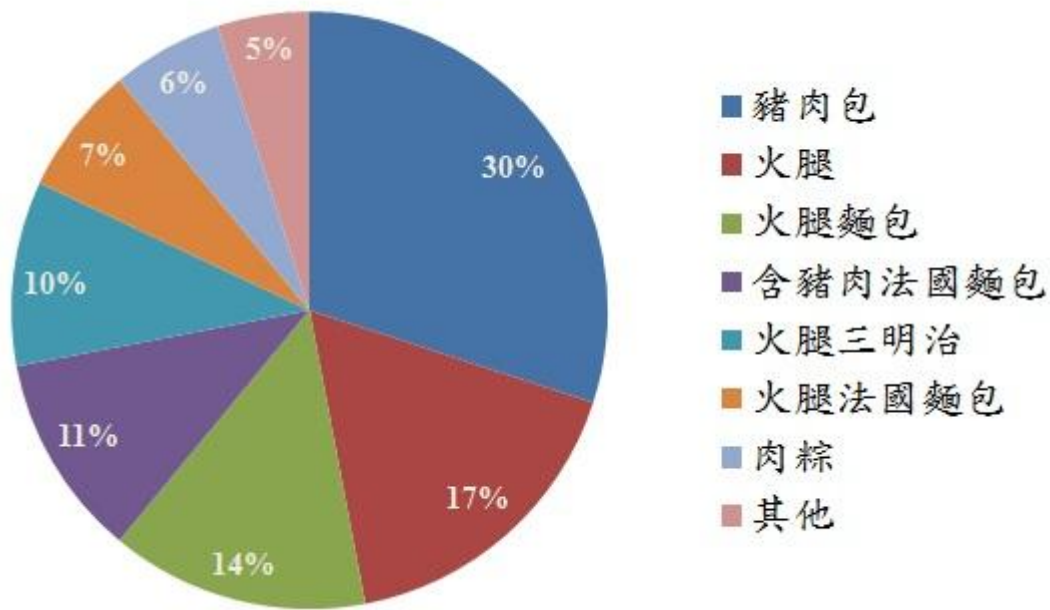


圖 4、檢出之越南 59 件非洲豬瘟病毒陽性豬肉類製品，以豬肉包(30%)及火腿(17%)之數量最多，其次為火腿麵包(14%)及含豬肉法國麵包(11%)。

表 1：qPCR 引子對及探針序列：

Primer/probe	Sequence (5' - '3)
qASF-OIE-F	5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3' (sense)
qASF-OIE-R	5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3' (anti-sense)
TS6R	GAC TCC CGC TCT CCA ACA AGG

表 2：qPCR 反應液配製：

qPCR 反應液配製	1 管(μL)
KAPA Probes Master mix	12.5
20μM Primer (qASF-OIE-F)	1
20μM Primer (qASF-OIE-R)	1
10 μM Probe (qASF-Probe 1)	1
DEPC-treated Water	6.5
Template (核酸)	3
反應總體積	25

表 3 : PCR 以及 nested-PCR 反應之 3 組引子對序列

	Primer	Type	Sequence (5'-3')
Set 1	72UR	First forward	5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3'
	72DF	First Reverse	CAT CTT CAA CAC CCG CCT C
	FOR3	Nested forward	5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3'
	REV2	Nested Reverse	5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'
Set 2	PPA outer 2F	First forward	5'-TCGCAGTAGTAAACCAAGTTTCG-3'
	PPA outer 1R	First Reverse	5'-TGTCTTATTGCTAACGATGGGAAG-3'
	PPA-1	Nestedforward	5'-AGTTATGGGAAACCCGACC-3'
	PPA-2	NestedReverse	5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3'
Set3	CVR1	First forward	5'-ACT TTGAAACAGGAA ACWAATGATG-3'
	CVR2	First Reverse	5'-ATATTTTGTAAATATGTGGGCTGCTG-3'
	ORF9L-F	Nestedforward	5'-AATGCGCTCAGGATCTGTAAATCGG-3'
	ORF9L-F	NestedReverse	5'-TCTTCATGCTCAAAGTTCGTATACCT-3'

表 4 : PCR 反應液配製 :

First PCR 反應液配製	1 管(μL)
KAPA Master mix	12.5
20μM forward Primer	1
20μM reversed Primer	1
DEPC-treated Water	7.5
Template (核酸)	3
反應總體積	25

表 5 : nested-PCR 反應液配製 :

Nested-PCR 反應液配製	1 管(μL)
KAPA Master mix	12.5
20μM forward Primer	1
20μM reversed Primer	1
DEPC-treated Water	9.5
Template (核酸)	1
反應總體積	25

參考文獻

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.8.1, 2018, Office International Des Epizooties; OIE.
2. Bastos AD, Penrith ML, Crucièrè C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann ER, Thomson G. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch Virol 148:693-706. 2003.
3. Brown VR, Bevins SN. A Review of African swine fever and the potential for introduction into the United States and the possibility of subsequent establishment in feral swine and native ticks. Front Vet Sci 5: 11. 2018.
4. Frant M, Woźniakowski G, Pejsak Z. African swine fever (ASF) and ticks. No risk of tick-mediated ASF spread in Poland and Baltic States. J Vet Res 61: 375-380. 2017.

5. Franzoni G, Graham SP, Sanna G, Angioi P, Fiori MS, Anfossi A, Amadori M, Dei Giudici S, Oggiano A. Interaction of porcine monocyte-derived dendritic cells with African swine fever viruses of diverse virulence. *Vet Microbiol* 216: 190-197. 2018.
6. Herrera-Ibatá DM, Martínez-López B, Quijada D, Burton K, Mur L. Quantitative approach for the risk assessment of African swine fever and classical swine fever introduction into the United States through legal imports of pigs and swine products. *PLoS One* 12: e0182850. 2017.
7. Herrera-Urbe J, Jiménez-Marín Á, Lacasta A, Monteagudo PL, Pina-Pedrero S, Rodríguez F, Moreno Á, Garrido JJ. Comparative proteomic analysis reveals different responses in porcine lymph nodes to virulent and attenuated homologous African swine fever virus strains. *Vet Res* 49: 90. 2018.
8. Kolbasov D, Titov I, Tsybanov S, Gogin A, Malogolovkin A. African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. *Emerg Infect Dis* 24: 796-798, 2018.
9. NixR J, Gallardo C, Hutchings G, Blanco E, Dixon L K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* 151: 2475-2494. 2006.
10. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, Heath L. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound Emerg Dis* 65: 420-431. 2018.
11. Schulz K, Staubach C, Blome S. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet Res* 48: 84. 2017.
12. Sánchez-Cordón PJ, Montoya M, Reis AL, Dixon LK. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet J* 233: 41-48. 2018.
13. Tao W, Yuan S, Hua-Ji Q. African Swine Fever: An Unprecedented Disaster and Challenge to China. *Infect Dis Poverty* 7:111. 2018.
14. Tapanut Songkasupa, Arphaphorn Dokphut, Prakit Boonpornprasert. Detection of African swine fever virus in confiscated pork products brought into Thailand during 2018–2019. *Thai J Vet Med* 50: 257-259. 2020.

African swine fever virus surveillance in confiscated meat products and disinfecting blankets samples from the border control authority in Taiwan

C Wang^{*}, CH Pan, YL Huang, CY Chang, KJ Tsai, LC Hung, MC Deng

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract To date, no commercial vaccines are available for African swine fever (ASF). Pig (*susscrofa*) is the only species that is adversely affected by ASF virus (ASFV) which includes domestic pig and wild boar. When infected by ASFV, the mortality could be 100% in pigs. It is well known that meat product contaminated with ASFV is the major source for ASF invasion or spread to new geographic area. Fresh or un-cooked meat products brought by passengers from epidemic area of ASFV are very concerned by custom or border control authority. Therefore, the aim of the present study was to investigate ASFV in confiscated meat products and cotton swap samples from disinfectant mat obtained from the border control authority. A total of 3,146 illegal meat products and 1,282 pieces of disinfection blanket swabs were detected. Of which by PCR, 248 of meat products were ASFV positive and all of the disinfection blanket swabs were ASFV negative. Among 248 ASFV positive illegal meat products, 189 items were from China and 59 items were from Vietnam, respectively. The phylogenetic results revealed all the ASFV positive sample are belonged to genotype II virus. The attempt to isolate ASFV from positive samples was unsuccessful. These results indicated ASFV could be detected from the illegal meat products, and its risk of ASFV invasion should be highly concerned.

Keywords: *African swine fever, illegal meat products, disinfection blanket.*

病例報告—石虎之貓疥癬蟲感染症

陳彥堯^{1*}、李敏旭¹、涂央昌¹、許偉誠¹、胡書佳¹、官南綾²、吳建志²、
徐小晴³、林桂賢³、詹芳澤³、李璠¹

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所疫學研究組

²行政院農業委員會家畜衛生試驗所生物研究組

³行政院農業委員會特有生物研究保育中心

摘要 本病例為一成年雄性野生石虎，於路邊被發現呈虛弱瀕死狀態，在送達特有生物研究保育中心急救站前死亡，遂轉送至本所進行病理學檢查。外觀檢查可見消瘦、肌肉量極少，雙側耳翼、顏面部及頭頸部體表可見結痂樣皮膚病灶，表皮呈不規則皺褶樣增厚，毛髮糾結形成鱗片狀或裂片狀。刮取皮膚鏡檢，可見大量不同發育階段之疥蟲 (mite)，包含蟲卵、幼蟲、若蟲及成蟲，成年疥蟲體型趨近於圓形，大小約 180-200 x 200-220 μm。皮膚檢體之 PCR 檢測結果呈貓疥癬蟲 (*Notoedres cati*) 核酸陽性。剖檢病變可見多發性嚴重創傷、腸道貓蛔蟲 (*Toxocara cati*) 及貓條蟲 (*Taenia taeniaeformis*) 感染、肝細胞脂肪變性 (hepatocellular fatty degeneration) 及輕微間質性肺炎。根據上述結果，判斷該染患嚴重貓疥癬蟲感染症 (notoedric mange) 的石虎直接致死原因應為嚴重創傷。

關鍵字：石虎、貓疥癬蟲、貓蛔蟲、貓條蟲。

緒言

貓疥癬蟲 (*Notoedres cati*) 是一種哺乳動物之皮膚外寄生蟲，主要感染家貓及野生貓科動物，又名貓節痂蟎，生物分類上屬於節肢動物門 (*Arthropoda*)、蛛形綱 (*Arachnida*)、疥蟎科 (*Sarcoptidae*) 之 *Notoedres* 屬，*Notoedres* 屬的疥蟲多見於食肉目貓科、兔形目、齧齒目及翼手目動物，其分類下僅貓疥癬蟲會感染貓科動物。貓疥癬蟲具有高度傳染性，廣泛分布於全世界之家貓，亦有數個國家曾發表野生貓科動物感染貓疥癬蟲之病例報告，如美國、巴西、南非、瑞士等，感染物種則包含美洲豹貓 (*Leopardus pardalis*)、短尾貓 (*Lynx rufus*)、美洲獅 (*Puma concolor*)、佛羅里達山獅 (*Puma concolorcoryi*)、獵豹 (*Acinonyx jubatus*) 及歐亞猞猁 (*Lynx lynx*) 等[12,13,16,17]，報告指出嚴重貓疥癬蟲感染症可成為野生貓科動物死亡的主要原因[10]。一般認為貓疥癬蟲對貓科動物具有高度宿主專

一性，僅有極少數犬及人類感染之案例[1, 5]，但目前已存在越來越多非貓科動物發現貓疥癬蟲感染之病例，如浣熊科 (*Procyonidae*) 之白鼻浣熊 (*Nasua narica*)、蓬尾浣熊 (*Bassariscus astutus*) 及北美浣熊 (*Procyon lotor*)，靈貓科 (*Viverridae*) 之白鼻心 (*Paguma larvata*) 及蝟科 (*Erinaceidae*) 之非洲小侏儒刺蝟 (*Atelerix albiventris*) 等[6,7,8,17,18]。

貓疥癬蟲是一種專性外寄生蟲 (obligate ectoparasite)，在貓科動物間具有高度傳染性[14]，離開宿主體外僅能於環境中存活數天，因此通常需和已感染動物直接接觸而傳染，藉物媒介 (fomite) 傳染機率較低。最早出現病變的位置多為耳翼邊緣，接著逐漸往顏面部及頸部擴散，並可能藉由貓科動物的理毛行為再擴散到腳掌及會陰部[9]。貓疥癬蟲的完整生活史皆於表皮角質層 (stratum corneum) 內完成，已受精之雌性成蟲會在角質層上鑿洞形成表皮隧道 (epidermal tunnel)，並於隧道內產卵，幼蟲 (larva)

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

孵化後直接以宿主皮膚作為食物來源，開始往隧道開口（即皮膚淺表層）方向爬行、鑿洞，形成一個蛻皮袋（molting pocket），並在裡面蛻變為第一期若蟲（first nymphal stage）。若蟲階段活動力極佳，第一期若蟲會持續爬行，在角質層上開鑿出新的隧道，並於裡面蛻變為第二期若蟲（second nymphal stage），重複爬行、開鑿隧道之過程，最後蛻變為性成熟之成蟲。雄性成蟲會爬行至其他隧道，尋找隧道內的雌性成蟲並與其完成交配。受精後的雌性成蟲一天約可產下3-4顆卵，蟲卵在4-5天後孵化，完整生活史約歷時17-21天，因此，貓疥癬蟲可在宿主表皮上快速繁衍，並主要藉由幼蟲及若蟲階段不斷爬行和鑿洞的過程傳染至其他宿主[14]。

臨床上，感染動物常見惡病質（cachexia）、顯著低血糖、大面積化膿性滲出性表皮炎、局部皮膚紅斑（erythema）及脫毛等[12]，又因皮膚劇癢而出現自殘行為，進而產生繼發性細菌感染，嚴重且未接受治療之動物可能導致死亡[1, 9]。不同感染進程呈現之皮膚病變亦有所差異，感染初期（即急性炎症反應期）皮膚常見表皮脫落（excoriation）、出血性痂皮（hemorrhagic crust）及局部斑塊狀脫毛（partial patchy alopecia）；感染後期（即慢性炎症反應期）則可見皮膚形成灰色厚鱗片及痂皮（thick gray scales and crusts）、苔蘚化（lichenification）及皮膚皺褶樣（wrinkled skin）[12]。

診斷方面，依據病變分布位置及劇癢之臨床症狀可初步懷疑貓疥癬蟲感染，再進一步藉由皮膚刮取物直接鏡檢進行診斷[14]。貓疥癬蟲的蟲體接近圓形或短橢圓形，成年個體大小約為180-200 x 200-240 μm ，體型較疥癬屬（*Sarcoptes*）寄生蟲小，蟲卵呈橢圓形，長度約為100 μm ，貓疥癬蟲之其他形態特徵包含兩對未分節且具吸盤之前肢、兩對長度未超過身體邊界之後肢、較短小之背脊（dorsal spines）以及位於背側之肛門口（dorsal anus）[4]。組織病理學診斷可輔助觀察皮膚病變及蟲體分布位置，切片下可見表皮層角化過度（hyperkeratosis）及大量寄生於表皮層之蟲體，貓疥癬蟲會在表皮上形成特徵性隧道樣結構（tunneling），且可同時於單一隧道

內發現不同發育階段之蟲體。此外，亦可藉由分子生物學核酸檢測方式進行物種鑑定。

病例報告

病歷

108年12月31日於苗栗縣銅鑼鄉發現一虛弱石虎倒臥於路邊，個體在送往位於南投縣的行政院農業委員會特有生物保育研究中心野生動物急救站之途中死亡。屍體經急救站獸醫師進行外觀檢查及耳翼皮膚刮取物鏡檢（skin scraping），判定此病例為一成年雄性石虎，其皮膚刮取物於鏡下可見大量疥蟲（mite），並於109年1月2日後送石虎全屍至本所動物疾病診斷中心進行病理剖檢及病因學診斷。

外觀檢查

本病例石虎之身體數值測量結果如下：吻肛長66公分、尾長33公分、體重3406公克，而正常成年雄性石虎之身體數值為吻肛長55-65公分、尾長27-30公分、體重3-6公斤，相比顯示本病例石虎之吻肛長及尾長略高於平均值，但體重屬於平均值之低值，且個體消瘦、肌肉量極少，體態評分（body condition score, BCS）為1.5/5（圖1）。

外觀檢查可見體表多發局部至合併性區域有結痂樣皮膚病變，病灶分布位置以雙側耳翼、眼瞼周圍、顏面部及頭頸部較為顯著。病灶區皮膚呈皺褶樣不規則增厚，毛髮因滲出液糾結而呈鱗片狀（scaly）或裂片狀（fissuring），有大量灰褐色、油膩樣痂皮組織覆蓋於表皮上，局部區域皮膚則可見紅斑（erythema）、出血及斑塊狀脫毛（圖2）。因顯著皮膚病變使頭部外觀及眼瞼皆呈現腫脹，此外，石虎具特徵性之額頭灰白色縱帶及耳後白色斑塊亦因結痂樣病變覆蓋而呈不明顯狀（圖3）。

皮膚刮取物鏡檢（skin scraping）

刮取少量耳翼痂皮組織置於載玻片上，覆蓋生理食鹽水及蓋玻片，以光學顯微鏡進行直接濕壓片（wet mount）鏡檢，低倍視野下可見大量不同發育階段之疥蟲，包含蟲卵（大小約80 x 120 μm ）、幼蟲、若蟲、雌性及雄性成蟲（大小約180-200 x 200-220

µm)，同時可見大量葡萄串樣黑褐色物質，疑為表皮屑及疥蟲的糞便（圖4）。疥蟲之幼蟲階段具6隻腳（前肢2對、後肢1對）；若蟲及成蟲階段皆具8隻腳（前肢2對、後肢2對），兩者外觀相似，僅差別於體型大小及是否已性成熟。成年疥蟲身體趨近於圓形，前肢具有細長且未分節之前附毛（pretarsi），肛門孔位於後段身體之背側（dorsal anus），雌性成蟲體內可見發育中之蟲卵（圖5）。

剖檢肉眼病變

主要剖檢病變包含全身多處創傷、脂肪肝、營養狀態不良及腸道內寄生蟲感染。創傷病變分布如下：

1. 寰樞椎關節處斷裂，頸部腹側肌肉出血；
2. 肋間肌多處穿孔性撕裂傷及出血（圖6）；
3. 胸部及腹部皮下水腫及肌肉出血（圖8）；
4. 胸腔有少量血塊鬱積；
5. 氣管及左、右支氣管分叉處可見凝血塊（圖7）；
6. 肺臟斑駁潮紅且濕重，右側膈葉出血。肝臟呈土黃色且質地較脆，表面有多處裂隙，由於裂隙處及腹腔內未見明顯出血，應為死後屍體搬運過程造成肝臟破裂（圖8）。此外，體腔內脂肪量極少、心臟冠狀溝脂肪呈漿液性萎縮（圖9），再加上前述瘦削，因此評估其營養狀態低下。檢視腸道則可見小腸黏膜面潮紅，腸腔內同時存在蛔蟲及條蟲蟲體。前段小腸以蛔蟲寄生為主，蟲體呈黃白色絲狀，長約3-5公分，頭端呈箭形（圖10）；後段小腸則以條蟲寄生為主，蟲體呈乳白色扁平狀、由多個節片構成，長約5-10公分（圖11）。直腸內容物中混有大量毛髮。

組織病理學檢查

以10%中性福馬林固定後的組織經修整、脫水、石蠟包埋及切片，再以蘇木紫-伊紅染色（hematoxylin and eosin stain, H&E stain）進行組織病理學判讀。

耳翼：表皮組織可見瀰漫性顯著上皮角化不全的角化過度（parakeratotic hyperkeratosis）、棘皮增厚（acanthosis）及痂皮組織（serocellular crust）覆蓋（圖12）。增生之角質層有多個向深層凹陷的隧道樣結構，其中可見不同發育階段之疥蟲蟲卵與蟲體，包含幼蟲、若蟲及成蟲（圖13）。成蟲大小約180 x 200 µm，具有約4 µm厚之幾丁質外骨骼（chitinous exoskeleton）、角質背脊（dorsal spines；cuticular

spines）、血淋巴體腔（hemocoelae）、橫紋肌、關節附肢（jointed appendages）、消化道及生殖腺；蟲卵大小約60 x 80 µm，具有約5 µm厚之卵殼及嗜鹼性球形內容物（basophilic globular material）（圖14）。於表皮下方之淺層真皮組織中，可見少量淋巴球及漿細胞浸潤。

肝臟：肝小葉中心靜脈區（即zone 3）可見鬱血；中心靜脈周圍區域（即zone 2）呈現嚴重肝細胞脂肪變性（hepatocellular fatty degeneration），細胞質內可見大小不一之脂肪油滴；門脈區（即zone 1）之肝細胞型態則無明顯異常（圖15）。

肺臟：肺泡壁呈輕微增厚並可見淋巴球及漿細胞浸潤；局部廣泛性區域可見大量紅血球蓄積於肺泡腔，顯示有局部性出血；部分肺泡腔內則蓄積有不等量的嗜伊紅性蛋白質性滲出液（eosinophilic proteinaceous exudate），顯示有肺水腫（圖16）。

小腸：腸腔內可見條蟲（Cestoda）及線蟲（Nematoda）寄生。條蟲的節片（proglottid）無體腔結構，僅具生殖腺、無消化道，可見特徵性間質細胞內石灰小體（calcareous corpuscles）（圖17）；線蟲橫截面可見假體腔結構（pseudocoelom），並有角質層（cuticles）、縱向肌肉層、腸管及生殖腺。

胃：胃黏膜可見少量線蟲幼蟲，疑似為線蟲幼蟲移行。

腹壁肌肉：骨骼肌束外圍之筋膜呈現嚴重水腫及出血，骨骼肌纖維呈腫脹、玻璃樣變性、壞死及橫紋消失（Zenker's necrosis）。

病理形態學診斷

耳翼：皮膚炎，增生性，瀰漫性，慢性，嚴重，伴隨顯著角化不全之角化過度、痂皮形成及大量角質內疥蟲（貓疥癬蟲）（Pinna：dermatitis, proliferative, diffuse, chronic, severe with marked parakeratotic hyperkeratosis, serocellular crust formation, and numerous intracorneal mites consistent with *Notoedres cati*）

肝臟：肝細胞脂肪變性，小葉中心性，瀰漫性，嚴重，伴隨鬱血（Liver：hepatocellular fatty degeneration, centrilobular, diffuse, severe with congestion）

肺臟：間質性肺炎，淋巴球-漿細胞性，瀰漫性，亞急性，輕度，伴隨肺水腫及出血（Lung：interstitial pneumonia, lymphoplasmacytic, diffuse, subacute, mild with pulmonary edema and hemorrhage）

小腸：條蟲及蛔蟲寄生（Small intestines：Cestoda and Nematoda infestation）

胃：線蟲幼蟲移行（Stomach：nematode larva migration）

腹壁肌肉：峇克氏變性及壞死，局部廣泛性，嚴重，伴隨筋膜炎水腫及出血（Skeletal muscles of abdominal wall：Zenker's degeneration and necrosis, locally-extensive, severe with fascial edema and hemorrhage）

微生物學檢測

寄生蟲鑑定

除前述皮膚刮取物鏡檢、腸道寄生蟲肉眼觀察及組織病理學等寄生蟲形態學檢查外，另採取皮膚病灶刮取物及兩種腸道寄生蟲進行分子生物學鑑定。待測檢體製成乳劑後，以MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I（Roche）萃取核酸，皮膚檢體分別參考Stephenson等人於2013年發表之貓疥癬蟲及Wong等人於2015年發表之人疥癬（*Sarcoptes scabiei*）特異性引子對進行聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction, PCR）[16, 21]。貓疥癬蟲之引子對序列分別為NCITS2F（5'-GAACGCACATTGCAGCCATTGGA-3'）及NCITS2R（5'-AGAACCCTCTGAATCGCACCGA-3'），目標增幅基因為internal transcribed spacer 2（ITS2）片段，預期產物大小為241 bp，反應條件如下：加熱至94℃，3分鐘，94℃（30秒）、58.3℃（30秒）、72℃（1分鐘），共進行35個循環，最後再以72℃反應5分鐘。人疥癬之引子對序列分別為scabF1（5'-CTTATTATTCCTGGATTTGGRTA-3'）及scabR2（5'-CTAATTTTCCTCCTAATATTGTWGA-3'），目標基因為cytochrome c oxidase subunit 1（COX1）片段，預期產物大小為250 bp，反應條件如下：加熱至95℃，10分鐘，95℃（1分鐘）、55℃（1分鐘）、72℃（1分鐘），共進行40個循環，

最後再以72℃反應10分鐘。反應完成之PCR產物取8 μL以2%瓊膠進行電泳，以Nancy-520®（Sigma-Aldrich）染色後於紫外燈下檢視，結果以貓疥癬蟲特異性引子對進行反應之PCR產物於241 bp處出現陽性條帶（圖18），並將此PCR產物送至明欣生物科技有限公司（Mission Biotech）進行定序，序列與BLAST® NCBI資料庫比對，結果與貓疥癬蟲（登錄號：AF251801）之基因序列相似度最高，達97.92%（235/240 bp）。以人疥癬特異性引子對進行反應之PCR產物於瓊膠電泳中則未見任何條帶。

腸道寄生蟲之分子生物學檢測分別參考Floyd等人於2005年發表之線蟲（phylum *Nematoda*）及Van Steenkiste等人於2015年發表之條蟲（class *Cestoda*）特異性引子對進行PCR反應[2, 19]，經定序後，鑑定此兩種腸道寄生蟲分別為貓蛔蟲（*Toxocara cati*）及貓條蟲（*Taenia taeniaeformis*）。有關本病例寄生蟲PCR檢測之標的檢體、待測病原及其特異性引子對、檢驗及定序結果（相似度）及參考文獻詳列如表1。

其他病原核酸檢測

利用PCR、反轉錄聚合酶鏈反應（reverse transcription PCR, RT-PCR）或巢式聚合酶鏈反應（nested PCR）檢測各組織臟器是否有其他食肉目野生動物可能潛伏感染之病原核酸，檢測病原項目包含小病毒（*carnivore protoparvovirus 1*）、貓傳染性腹膜炎病毒（*feline infectious peritonitis virus*）、犬瘟熱病毒（*canine distemper virus*）、貓第一型疱疹病毒（*feline herpesvirus type 1*）及貓披衣菌（*Chlamydia felis*）。本病例之胃壁及胃內容物檢體以nested PCR檢驗呈現小病毒陽性，PCR產物經定序及比對後，確認第2a型犬小病毒（*canine parvovirus type 2a*, CPV-2a），其餘貓傳染性腹膜炎病毒、犬瘟熱病毒、貓第一型疱疹病毒及貓披衣菌之核酸檢測結果皆為陰性。本病例進行食肉目野生動物病原監測之檢驗方法、檢測臟器或部位、檢驗與定序結果（相似度）及所引用的特異性引子對詳列於表2。

狂犬病抗原檢測

以免疫螢光抗體染色法（fluorescent antibody

test, FAT) 進行腦組織狂犬病抗原檢測，採樣大腦海馬迴、小腦及腦幹部位製作腦組織捺壓片，以-20°C 丙酮固定30分鐘，待丙酮揮發後，再於捺壓片上覆蓋 10 倍稀釋之狂犬病螢光標示抗體 (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Millipore®)，置於 37°C 恆溫箱中避光感作30分鐘。接著以磷酸鹽緩衝溶液洗滌2次，去除多餘水份後，覆蓋適量PBS-甘油封片液，蓋上蓋玻片，以螢光顯微鏡觀察。本病例腦組織FAT檢驗結果為狂犬病抗原陰性。

細菌分離

採樣的肺臟組織以一般培養基 (血液培養基) 及選擇性培養基 (MacConkey agar) 進行細菌分離，兩者均未分離到有意義之病原菌。

農藥檢測

採集的胃內容物以氣相層析質譜儀 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 及高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 進行有機磷類及氨基甲酸鹽類農藥檢測，結果皆呈陰性。

討論

本病例之立即致死原因 (immediate cause of death) 應為全身性嚴重創傷，病變分布範圍廣泛，從頭頸部至後腹部體壁皆可見穿孔性或非穿孔性肌肉撕裂傷及出血，胸腔亦可見少量血塊淤積及肺臟出血，推測為其他動物攻擊所導致。經剖檢、組織病理學檢查及實驗室檢查，該石虎個體檢出貓疥癬蟲感染症 (notoedric mange)、營養狀況低下 (poor body condition)、肝細胞脂肪變性及腸道內寄生蟲 (貓條蟲及貓蛔蟲)。除創傷以外，貓疥癬蟲感染症為本病例最顯著之病變，且皮膚病變已覆蓋眼瞼周圍，可能影響其視力。由於嚴重外寄生蟲感染導致之個體不適及虛弱、消瘦皆可能直接影響動物狩獵攝食的能力，進而導致身體更加虛弱，增加遭受其他動物攻擊 (如遊蕩犬、貓) 或車輛撞擊的風險，因此嚴重貓疥癬蟲感染症可能為導致本病例間接死亡的原因。

診斷上，肉眼觀察到皮膚病變時，如單純依據動物臨床症狀、病變分布位置及肉眼病變等資訊，難以

確診由何種病因所引起，由於可能的鑑別診斷繁多，包含了異位性過敏 (atopic allergy)、食物過敏、跳蚤過敏、蟎蟲症 (cheyletiellosis)、耳疥蟲感染症 (otodectic mange)、蝨症 (pediculosis)、自體免疫性皮膚病等[9]，因而需藉由深層皮膚刮取物鏡檢 (deep skin scraping) 以檢視是否為外寄生蟲所引起，再於光學顯微鏡下觀察寄生蟲之形態特徵，疥蟎科 (*Sarcoptidae*) 寄生蟲之寄生數量非常龐大，通常較容易從皮膚刮取物鏡檢中觀察到。最常見於貓科動物皮膚感染之疥蟲為貓疥癬蟲，其次為人疥蟎，兩者體型有明顯差異，貓疥癬蟲體型較人疥蟎小，體型分別為 180-200 x 200-240 μm 及 250-400 x 300-600 μm，其他可鑑別兩種寄生蟲之特徵包含蟲卵大小、背脊 (dorsal spine) 大小及肛門開口位置等，兩者之生物分類學 (taxonomy)、成蟲體型、蟲卵大小、形態學特徵、宿主範圍和病變分布位置之比較詳列於表3。

2002年Ryser-Degiorgis等人曾在一隻歐亞猞猁 (*Lynx lynx*) 身上同時檢出貓疥癬蟲及人疥蟎[12]，為全世界首見混合感染貓疥癬蟲及人疥蟎之病例報告。本病例於皮膚刮取物鏡檢及組織病理切片檢出之蟲體外形皆一致，並同時以貓疥癬蟲及人疥蟎之特異性引子對進行PCR檢測，結果僅貓疥癬蟲呈陽性，惟本檢測缺乏人疥蟎之PCR陽性對照，因此無法完全排除同時有人疥蟎共同感染之可能性。如有兩種以上外寄生蟲混合感染之診斷需求，應針對多個不同部位皮膚進行採樣及檢測，並建立所有疑似病原之PCR檢測陽性對照，以提升病原診斷可信度。

治療方面，抗寄生蟲藥物可有效改善貓疥癬蟲感染之症狀，常用藥物包含 ivermectin (0.2-0.3 mg/kg，口服或皮下注射，每2週1次，持續4-6週)、selamectin (6 mg/kg，表皮局部給藥，2週間隔內給予3次)、5% amitraz (以水稀釋至0.015%後洗潔全身體表，7天1次，持續3週) 及 2-3% lime sulphur (洗潔全身體表，5-7天1次，持續2-3週)，未發生嚴重併發症之動物通常在接受治療後復原情況良好。針對嚴重皮膚搔癢症狀者，可給予口服糖皮質素 (prednisolone 2 mg/kg，1天1次，持續7-10天)

減緩症狀。嚴重繼發性細菌感染者可能併發膿皮症 (pyoderma)，需給予全身性抗生素治療，持續3-4週[9]。

至於野生貓科動物感染貓疥癬蟲之源頭追溯，可透過病例拾獲地點之動物族群調查及回溯式流行病學分析。Ryser-Degiorgis等人發現歐亞猓獾可能透過接觸或捕食家貓 (*Felis catus*) 而感染貓疥癬蟲，以及接觸或捕食野生赤狐 (*Vulpes vulpes*) 而感染人疥癬 [12]。因臺灣目前僅存石虎一種原生貓科動物，且族群數量稀少、地理分布密度低，又貓疥癬蟲於體外存活時間僅數天，藉物媒介傳染機率較低，故推測本病例石虎最可能透過與帶原貓疥癬蟲之家貓直接接觸而感染，如爭奪領地或食物、石虎捕食體弱或幼年家貓等，顯示遊蕩貓隻可能增加石虎感染貓疥癬蟲之風險。貓疥癬蟲感染非貓科動物的病例非常少見，但仍有跨物種及人畜共通感染之可能性，如有救傷收容之動物感染貓疥癬蟲，需給予抗寄生蟲藥物治療，並避免與其他哺乳動物接觸，加強籠舍及環境清潔消毒，並做好人員安全防護。

其他檢驗結果方面，本病例於腸道檢出之貓條蟲 (*Taenia taeniaeformis*) 及貓蛔蟲 (*Toxocara cati*) 皆為家貓及野生貓科動物常見之消化道寄生蟲，通常在成年個體不會造成致命性感染。組織病理學檢查結果顯示，肺臟除創傷性出血病變外，亦可見輕微間質性肺炎，因此採樣呼吸道病原相關檢體包含肺臟、口腔拭子及眼窩拭子進行貓疱疹病毒 (FHV-1) 及貓披衣菌之PCR檢測，並送檢肺臟組織進行細菌分離，PCR及細菌分離結果皆為陰性，推測本病例可能為非上述常見的病毒及細菌性感染因子所引發之肺炎，可能的成因尚須考慮過敏、慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease)、不明原因性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia)、化學物質刺激、吸入異物等。在肝臟所見之小葉中心性肝細胞脂肪變性，須考量右心功能不健全所導致的肝臟鬱血性缺氧，亦可能與間質性肺炎的肺泡換氣功能下降導致之缺氧有關。此外，本病例亦進行多項食肉目野生動

物病原監測，包含小病毒、貓傳染性腹膜炎病毒、犬瘟熱病毒及狂犬病病毒，結果於胃壁及胃內容物檢體檢出CPV-2a核酸，然並未觀察到出血性腸炎、淋巴細胞流失或病毒包涵體等典型犬小病毒感染病變，因此進一步參考Wang等人於2020年發表之小病毒原位雜交技術 (*in situ* hybridization, ISH) [20]，針對本病例各臟器之組織切片進行小病毒ISH，結果亦皆為陰性，無法驗證核酸檢測陽性之結果，顯示nested PCR反應之敏感度極高，胃部組織僅含微量CPV-2a核酸，且未對個體造成病變，或許屬潛伏感染，然由於胃並非CPV-2a的標的器官，亦須考量此受檢石虎是否生前曾捕食過攜帶有或感染有CPV-2a的獵物 (如感染CPV-2a的遊盪犬、貓或其他野生動物)。

根據筆者等所知，本病例報告為臺灣首次發現之石虎貓疥癬蟲感染症，因貓疥癬蟲具有高度傳染性，且本病例為一成年雄性石虎，通常具有較大的活動領域範圍，可能曾接觸傳染其他石虎個體，不排除目前野外仍有石虎感染貓疥癬蟲之病例，又因貓疥癬蟲可造成感染動物消瘦、虛弱，甚至嚴重繼發性細菌感染，進而影響其狩獵攝食及躲避天敵或車輛之能力，嚴重貓疥癬蟲感染症有可能扮演臺灣石虎直接或間接致死的一個原因。如欲執行臺灣石虎貓疥癬蟲感染之流行病學調查，針對野外活體石虎，可參考Stephenson等人對美國北加州地區野生短尾貓 (*Lynx rufus*) 爆發貓疥癬蟲之監測方式[16]，採集野外個體糞便進行核酸篩檢；針對救傷收容或已死亡個體，如觀察到疑似寄生蟲性皮膚病灶，可直接進行皮膚刮取物鏡檢，再搭配PCR檢測及定序進行外寄生蟲物種鑑定。野生動物感染疥蟲之控制方式，針對族群感染之治療難度高，目前尚無成功於野外投予抗寄生蟲餌藥進行防控之相關文獻，多採用誘捕後給予抗寄生蟲藥物 (皮下注射ivermectin, 200 µg/kg, 單次) 之方式進行個體動物治療。其他可嘗試之疥蟲防控方法包含配戴驅蟲項圈及於感染熱點放置口服抗寄生蟲餌藥，但須考量驅蟲項圈之穩固性及同一動物可能發生重複食入餌藥造成劑量過高之問題[3,11]。

病例報告－石虎之貓疥癬蟲感染症



圖 1、送檢石虎外觀消瘦、肌肉量極少，體態評分 (body condition score, BCS) 為 1.5/5。

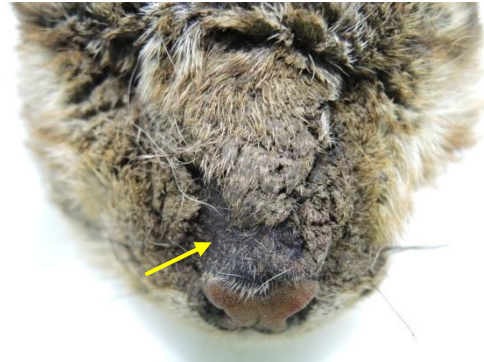


圖 2、鼻吻部皮膚呈不規則增厚，毛髮糾結形成鱗片狀或裂片狀，有大量灰褐色、油膩樣痂皮組織覆蓋於表皮上。近鼻頭處可見局部斑塊狀脫毛 (箭頭所示)。



圖 3、雙側耳翼具顯著結痂樣皮膚病變，石虎具特徵性之耳後白色斑塊因而呈不明顯狀。左側耳翼皮膚局部脫毛區域為急救站獸醫師採樣鏡檢處 (箭頭所示)。

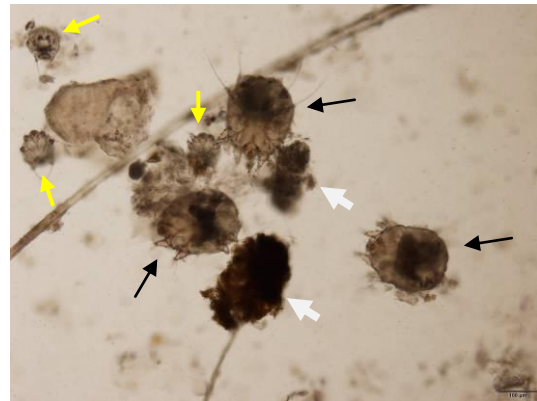


圖 4、皮膚刮取物鏡檢，可見不同發育階段之疥蟲 (mite)，包含幼蟲 (黃色箭頭所示) 及成蟲 (黑箭頭所示)，同時可見大量葡萄串樣黑褐色疑似表皮皮膚及疥蟲的排泄物 (白箭頭所示)。

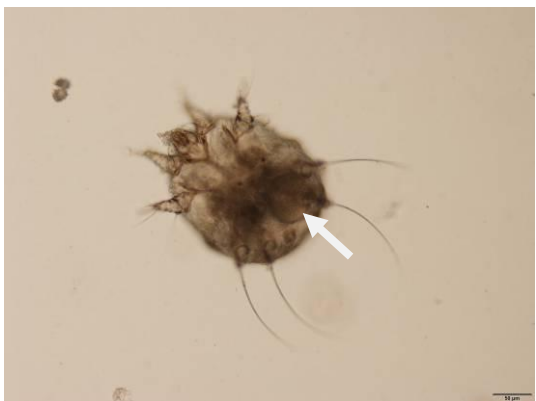


圖 5、成年疥蟲體型趨近於圓形，大小約 200 x 220 μm ，雌性蟲體內可見發育中之蟲卵 (箭頭所示)。



圖 6、肋間肌有多處穿孔性撕裂傷及出血。

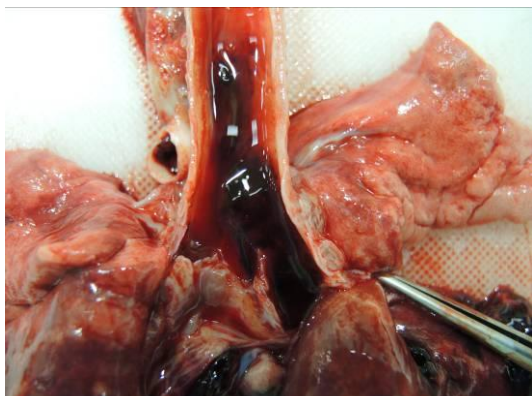


圖 7、氣管及左、右支氣管分叉處可見凝血塊。

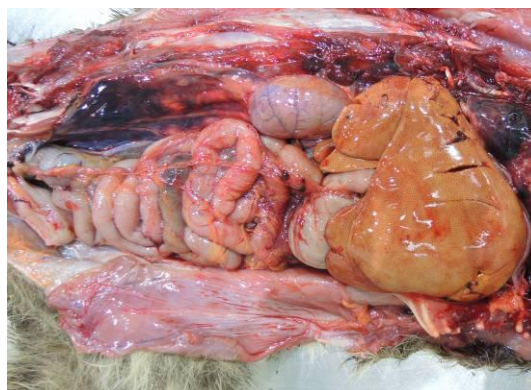


圖 8、腹壁肌肉多處出血，肝臟呈土黃色並有多處撕裂，腹腔內臟脂肪量極少。



圖 9、心臟冠狀溝脂肪呈漿液性萎縮。



圖 10、小腸黏膜面潮紅，前段小腸以蛔蟲寄生為主，蟲體呈黃白色絲狀，長約 3-5 公分，頭端呈箭形（箭頭所示）。

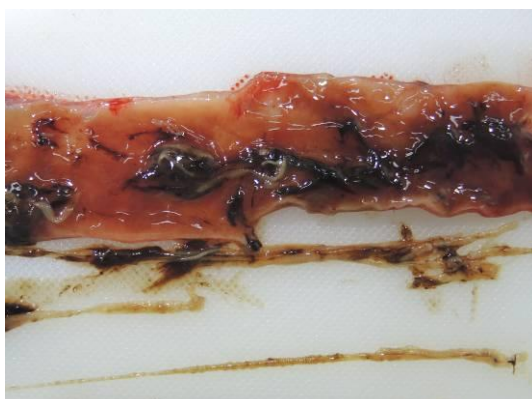


圖 11、後段小腸以條蟲寄生為主，蟲體呈乳白色扁平狀，由多個節片構成，長約 5-10 公分。

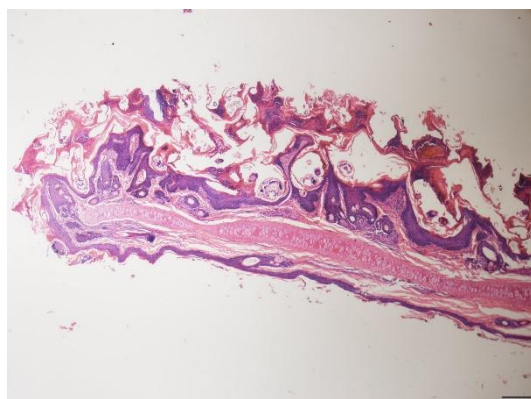


圖 12、耳翼：表皮層可見角化不全的角化過度（parakeratotic hyperkeratosis）、棘皮增厚（acanthosis）及痂皮組織（serocellular crust）覆蓋。

病例報告－石虎之貓疥癬蟲感染症

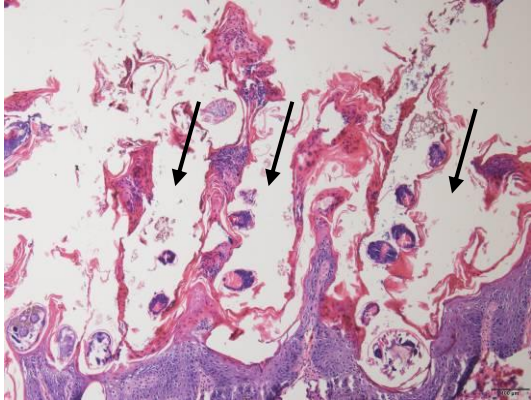


圖 13、耳翼：增生之角質層可見多個向深層凹陷之隧道樣結構（箭頭所示），其內有不同發育階段之疥蟲寄生。

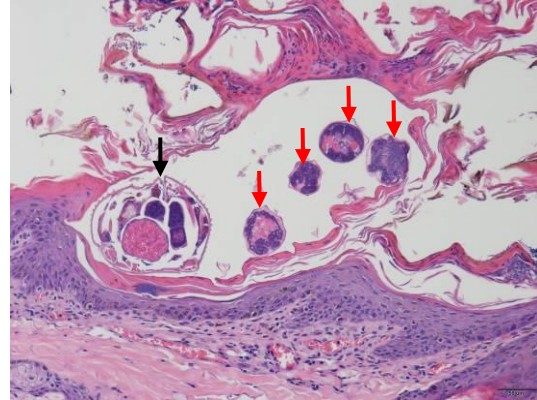


圖 14、耳翼：成年蟲體（黑箭頭所示）具有約 $4\ \mu\text{m}$ 厚之幾丁質外骨骼、短小之背脊（dorsal spines）、血淋巴體腔（hemocoel）、橫紋肌、關節附肢、消化道及生殖腺，成蟲體型約 $180 \times 200\ \mu\text{m}$ ；蟲卵（紅箭頭所示）大小約 $60 \times 80\ \mu\text{m}$ ，具有約 $5\ \mu\text{m}$ 厚之卵殼及嗜鹼性球型內容物（basophilic globular material）。

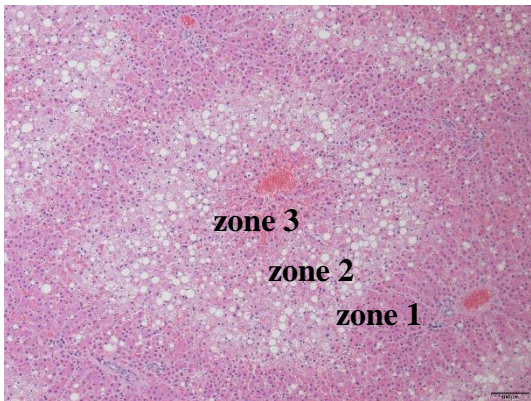


圖 15、肝臟：中心靜脈區（即 zone 3）可見鬱血；中心靜脈周圍之小葉中間區（即 zone 2）呈現嚴重肝細胞脂肪變性（hepatocellular fatty degeneration），細胞質內可見大小不一之脂肪油滴；門脈區（即 zone 1）之肝細胞型態則無明顯異常。

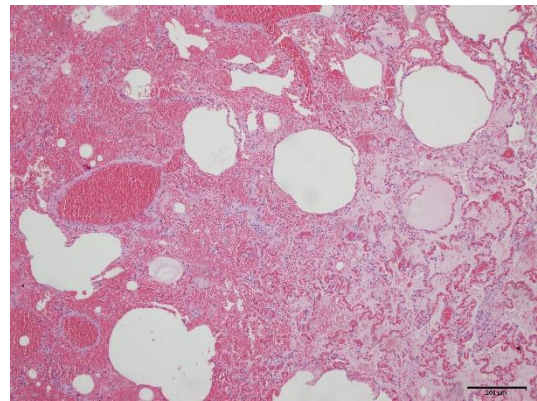


圖 16、肺臟：局部廣泛性區域可見肺泡腔內蓄積大量紅血球；部分的肺泡腔內則蓄積有不等量的嗜伊紅性蛋白質性滲出液。

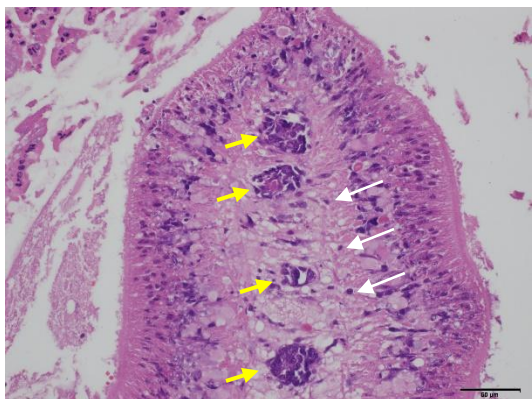


圖 17、小腸：腸腔內可見條蟲節片，蟲體無體腔及消化道，可見間質細胞內石灰小體 (calcareous corpuscles) (白箭頭所示) 及生殖腺 (黃箭頭所示)。

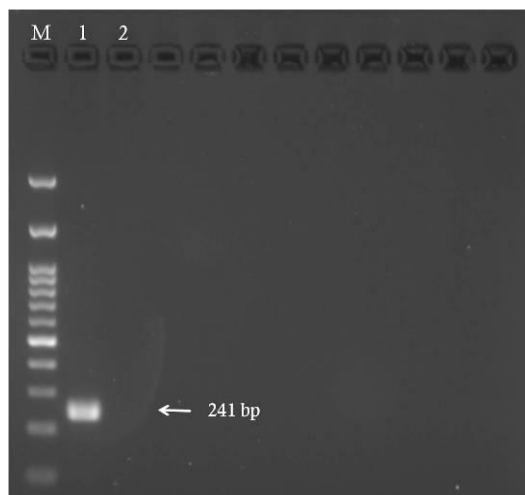


圖 18、以貓疥癬蟲 (*Notoedres cati*) 特異性引子對進行 PCR 檢測 (預期產物大小為 241 bp)。1: 皮膚病灶檢體; 2: 陰性對照 (DEPC 水); M: 100 bp 核酸標記。

表 1、本病例寄生虫 PCR 检测之标的检体、待测病原及其特异性引子对、检验及定序结果（相似度%）及参考文献。

标的检体	待测病原及其特异性引子对	检验及定序结果 (相似度%)	参考文献
皮膚病灶 刮取物	待测病原：猫疥癣虫 (<i>Notoedres cati</i>) NCITS2F(5'-GAACGCACATTGCAGCCATTGGA-3')及 NCITS2R(5'-AGAACCCCTCTGAAATCGCACCCGA-3') 标的基因：internal transcribed spacer 2 (ITS2) 预期产物大小：241 bp 待测病原：人疥螨 (<i>Sarcoptes scabiei</i>) scabF1 (5'-CTTATTATTCCTGGATTGGRTA -3')及 scabR2(5'-CTAATTTTCCTCCTAAATATTGTWGA -3') 标的基因：cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) 预期产物大小：250 bp	<i>Notoedres cati</i> (97.9%) PCR 阴性 ⁽¹⁾	Stephenson et al., 2013 [16] Wong et al., 2015 [21]
小腸線虫	待测病原：線虫 (phylum <i>Nematoda</i>) Nem_18S_F(5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3')及 Nem_18S_R(5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3') 标的基因：18S ribosomal DNA gene (18S) 预期产物大小：900 bp	<i>Toxocara cati</i> (100%)	Floyd et al., 2005 [2]
小腸條虫	待测病原：條虫 (class <i>Cestoda</i>) Dice1F(5'-ATTAAACCCTCAGTAAATTWCNTTRGATCATAAG-3') 及 Dice1R(5'-TAATACGACTCACTATAGCWGWACHAAATTTTHCG ATC-3') 标的基因：cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) 预期产物大小：570-585 bp	<i>Taenia taeniaeformis</i> (99%)	Van Steenkiste et al., 2015 [19]

註：⁽¹⁾本病例 *Sarcoptes scabiei* 之 PCR 检测缺乏阳性对照。

表 2、本病例進行食肉目野生動物病原監測之種類、檢驗方法、檢測臟器或部位、檢驗與定序結果（相似度%）及所引用之特異性引子對。

監測病原	檢驗方法	檢測臟器或部位	檢驗及定序結果（相似度%）	特異性引子對
小病毒 (<i>carnivore parvovirus 1</i>)	nested PCR	全臟器 ⁽¹⁾	胃壁及胃內容物 檢出 <i>canine parvovirus type 2a</i> (99%)	PV2-1639f (5'-GCATTTGGTAGACAACATGG-3')、 PV2-1669f (5'-ACYACAACAGGAGAAACACC-3')、 PV2-1964r (5'-GGTGCAATTTACATGAAGTCTTTGG-3') 標的基因：viral capsid protein 2 (VP2) gene 預期產物大小：326 bp 及 296 bp
貓傳染性腹膜炎病毒 (<i>feline infectious peritonitis virus</i>)	RT-PCR	全臟器	陰性	FIP-27520f (5'-GCCAACAACAACACACCTGGAG-3')、 FIP-27939r (5'-CATCTCAACCTGTGTGCATC-3') 標的基因：Nucleoprotein (N) gene 預期產物大小：420 bp
犬瘟熱病毒 (<i>canine distemper virus</i>)	RT-PCR	全臟器	陰性	CD-N367f (5'-TGATCCAGAGGATCATAGAC-3')、 CD-N797r (5'-CCTCAAAGATARGTCCTCAG-3') 標的基因：Nucleoprotein (N) gene 預期產物大小：431 bp
貓第一型疱疹病毒 (<i>feline herpesvirus type 1</i>)	PCR	口腔拭子、 眼窩拭子、肺臟	陰性	HerpF (5'-GACGTGGTGAATTAATCAGC-3')、 HerpR (5'-CAACTAGATTTCCACCAGGA-3') 標的基因：thymidine kinase 預期產物大小：287 bp (Seki et al., 2016) [15]
貓披衣菌 (<i>Chlamydia felis</i>)	PCR	口腔拭子、 眼窩拭子、肺臟	陰性 ⁽²⁾	oligo420 (5'-CAGGATACTTGTCTGGCTTTAA-3')、 oligo422 (5'-GCAAAGGATCGCAAGGATC-3') 標的基因：major outer membrane protein gene (MOMP) 預期產物大小：260 bp (Seki et al., 2016) [15]

註：⁽¹⁾ 全臟器包含腦、唾液腺、心、肝、脾、肺、腎、胃、胃內容物、小腸、大腸、膀胱、性腺、骨髓。⁽²⁾ 本病例 *Chlamydia felis* 之 PCR 檢測缺乏陽性對照。

<i>Notoedres cati</i>		<i>Sarcoptes scabiei</i>	
生物分類學	疥蟎科 (family Sarcopitidae) - <i>Notoedres</i> 屬 (genus <i>Notoedres</i>)。	疥蟎科 (family Sarcopitidae) - <i>Sarcoptes</i> 屬 (genus <i>Sarcoptes</i>)。	
成蟲體型	體型較小 (180-200x 200-240 μm)，趨近圓形。	體型較大 (250-400 x 300-600 μm)，橢圓形。	
蟲卵大小	卵圓形，長約 100 μm。	卵圓形，長約 100 -150μm。	
形態學特徵	背脊 (dorsal spine) 較短小，肛門口位於身體背側。	背脊較長，肛門口位於身體末端。	
宿主範圍	<ol style="list-style-type: none"> 1. 主要宿主為貓科動物。 2. 僅少數其他物種感染之病例(包含犬、人、浣熊科動物、白鼻心及非洲小侏儒刺蝟等)。 3. 目前尚未區分不同宿主特異性品種 (host-specific varieties; var.)。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 宿主範圍廣泛，涵蓋各種哺乳動物。 2. 可再區分為不同宿主特異性品種 (var.)，常見者如犬 (<i>S. scabiei</i> var. <i>canis</i>)、人 (<i>S. scabiei</i> var. <i>hominis</i>)、豬 (<i>S. scabiei</i> var. <i>suis</i>)、山羊 (<i>S. scabiei</i> var. <i>caprae</i>)、兔 (<i>S. scabiei</i> var. <i>cuniculi</i>) 等。 3. 貓科動物感染病例較少。 4. 專一性高，少見跨宿主特異性感染。 	
病變分布位置	主要分布於耳翼、頭部、頸部及腳掌，又稱頭部疥瘡 (head mange)。	病變分布範圍較廣泛，可呈全身性分布，較常見於耳翼及顏面部。	

參考文獻

1. Bowman DD, Hendrix CM, Lindsay DS, Barr SC. The Arthropods. In: Feline clinical parasitology. Iowa State University Press. Chapter 5, pp. 394-399, 2002.
2. Floyd RM, Rogers AD, Lambhead PJ, Smith C. Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene. Mol Ecol Notes, 5:611-612, 2005.
3. Foley J, et al. A synthetic review of notoedres species mites and mange. Parasitology, 143:1847-1861, 2016.
4. Kraabøl M, Gundersen V, Fangel K, Olstad K. The taxonomy, life cycle and pathology of *Sarcoptes scabiei* and *Notoedres cati* (Acarina, Sarcoptidae): A review in a Fennoscandian wildlife perspective. Fauna Norv, 35:21-33, 2015.
5. Leone F. Canine notoedric mange: A case report. Vet Dermatol, 18:127-129, 2007.
6. Ninomiya H, Ogata M. Notoedric mange in two free-ranging North American raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. Vet Dermatol, 13:119-121, 2002.
7. Ninomiya H, Ogata M, Makino T. Notoedric mange in free-ranging masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. Vet Dermatol, 14:339-344, 2003.
8. Pantchev N, Hofmann T. Notoedric mange caused by *Notoedres cati* in a pet African pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). Vet Rec, 158:59-60, 2006.
9. Paterson S. Parasitic skin disease. In: Manual of skin diseases of the dog and cat. 2nd ed. Blackwell Publishing. Chapter 7, pp. 115-135, 2008.
10. Riley SPD, Bromley C, Poppenga RH, Uzal FA, Whited L, Sauvajot RM. Anticoagulant exposure and notoedric mange in bobcats and mountain lions in urban southern California. J Wildl Manage, 71:1874-1884, 2007.
11. Rowe ML, Whiteley PL, Carver S. The treatment of sarcoptic mange in wildlife: a systematic review. Parasit Vectors, 12:99, 2019.
12. Ryser-Degiorgis MP, Ryser A, Bacciarini LN, Angst C, Gottstein B, Janovsky M, Breitenmoser U. Notoedric and sarcoptic mange in free-ranging lynx from Switzerland. J Wildl Dis, 38:228-232, 2002.
13. Scofield, Alessandra, Santos, Rafaelle Cuncha dos, Carvalho, Nadino, Martins, Áurea Linhares, Góes-Cavalcante, Gustavo. First record of notoedric mange in ocelot (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) in the amazon region, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet, 20:334-337, 2011.
14. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Feline scabies. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. W.B. Saunders, Chapter 6, pp. 483-484, 2001.
15. Seki MC, André MR, Carrasco ADOT, Machado RZ, Pinto AA. Detection of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus type-1 in non-domestic felids in Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci, 53:169-176, 2016.
16. Stephenson N, Clifford D, Worth SJ, Serieys LE, Foley J. Development and validation of a fecal PCR assay for *Notoedres cati* and application to notoedric mange cases in bobcats (*Lynx rufus*) in Northern California, USA. J Wildl Dis, 49:303-311, 2013.
17. Uzal FA, Houston RS, Riley SP, Poppenga R, Odani J, Boyce W. Notoedric mange in two free-ranging mountain lions (*Puma concolor*). J Wildl Dis, 43:274-278, 2007.
18. Valenzuela D, Ceballos G, García A. Mange epizootic in white-nosed coatis in western Mexico. J Wildl Dis, 36:56-63, 2000.
19. Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abbott CL. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). Mol Ecol Resour, 15:945-952, 2015.
20. Wang SL, Tu YC, Lee MS, Wu LH, Chen TY, Wu CH, Tsao EH, Chin SC, Li W T. Fatal canine parvovirus-2 (CPV-2) infection in a rescued free-ranging Taiwanese pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*). Transbound Emerg Dis, 67:1074-1081, 2020.
21. Wong SS, Poon RW, Chau S, et al. Development of conventional and real-time quantitative PCR assays for diagnosis and monitoring of scabies. J Clin Microbiol, 53:2095-2102, 2015.

Case Report—Notoedric Mange (*Notoedres cati* Infestation) in a Free-ranging Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*)

YW Chen^{1*}, MS Lee¹, YC Tu¹, WC Hsu¹, SC Hu¹, NL Kuan², CC Wu²,
HC Hsu³,GX Lin³,FT Chan³, F Lee¹

¹Division of Epidemiology, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

²Division of Biology, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

³Endemic Species Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The present case was a male, adult, free-ranging leopard cat (*Prionailurus bengalensis*), which was found weak and moribund on the roadside. The patient died before arrival to the Wildlife First Aid Station of Endemic Species Research Institute, and was then forwarded to AHRI for pathological examination. Grossly, the animal was emaciated with scant skeletal muscle masses. Crusted skin lesions were distributed at the pinnae, face, head and neck. The affected skin was irregularly thickened and wrinkled. The covering furs became scaly and fissuring. Skin scraping was performed and microscopic examination revealed a large number of eggs, larvae, nymphs, and adult mites. The adult mites were almost round with a size of approximately 180-200 x 200-220 µm. The skin sample was PCR-positive for *Notoedres cati*. Other findings included multiple severe traumatic lesions, *Toxocara cati* and *Taenia taeniaeformis* infestation, hepatocellular fatty degeneration, and mild interstitial pneumonia. Based on the above findings, the death of the leopard cat with severe notoedric mange was due to severe traumatic injury.

Keywords: leopard cat, *Notoedres cati*, *Toxocara cati*, *Taenia taeniaeformis*.

行政院農業委員會家畜衛生試驗所第 54 期研究報告

出版機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所
新北市淡水區中正路 376 號
02-2621-2111~3

發行人：邱垂章

總編輯：許聰文

審查委員：邱賢松 楊程堯 林文華 辛孟妍 張本恒 陳嫩玟
鄭謙仁 林昭男 龐飛 劉振軒

執行編輯：李璠

行政編輯：張仁杰、郭舒亭

印製者：華鑫電腦輸出中心
新北市淡水區博愛街 11 號
02-2625-2176 2625-9999

出版年月：中華民國 109 年 12 月

定價：新台幣參佰元

展售處：五南文化廣場台中市中山路 6 號 (04)2226-0330 轉 20
國家書店松江門市台北市松江路 209 號 (02)2518-0207
國家網路書店：<http://www.govbooks.com.tw>

Experimental Report of Animal Health Research Institute No.54

Printed Date：Dec. 2020

Price：NT \$ 300

GPN：2005200006

ISSN：0253-9136