

生醫用清淨種兔腦炎微孢子蟲感染症及泰勒氏病血清抗體結果分析

吳政學*、江俊儀、張家禎

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 腦炎微孢子蟲感染症為國內兔隻常見的人畜共通傳染病，泰勒氏病則是引起兔隻下痢死亡的重要傳染性疾病。本報告係針對行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所 2017 年至 2021 年之紐西蘭大白兔種兔，利用酵素結合免疫吸附分析法進行腦炎微孢子蟲感染症及泰勒氏病之血清抗體監測。結果顯示腦炎微孢子蟲感染症和泰勒氏病血清抗體陽性率分別為 165/1834 (9.00%) 及 292/1834 (15.92%)，二種疾病血清抗體陽性率在性別間無顯著差異，腦炎微孢子蟲在 2017 年及春夏季節有較高血清抗體陽性率 ($P < 0.05$)，而泰勒氏病分別在 2017 年、2018 年及秋季時有較高血清抗體陽性率 ($P < 0.05$)，本研究藉由適當的環境控制、定期消毒等防疫措施可將疾病血清抗體陽性率減低至 1% 左右。

關鍵詞：兔、腦炎微孢子蟲感染症、泰勒氏病、血清監測

緒言

腦炎微孢子蟲感染症是一種常見於兔隻造成腎臟及中樞神經病變的原蟲性疾病，致病原為腦炎微孢子蟲 (*Encephalitozoon cuniculi*)，臨床上可能因慢性感染而多年無症狀，也可能見肉芽腫性腦炎而呈現歪頭斜頸等神經症狀，其他主要病變為肉芽腫性腎炎及幼兔經由胎盤感染造成眼睛單側肉芽腫性葡萄膜炎，也會感染其他哺乳類動物如嚙齒類、馬、食肉動物及免疫缺陷的人類 [11, 12]。

泰勒氏病 1917 年首見於日本華爾滋小鼠 [17]，亦有在大鼠、倉鼠、沙鼠、麝鼠、幼馬、狗、猿猴等動物發現過 [6, 8]，兔隻病例則是在 1965 年於紐西蘭大白兔首次報告，造成離乳兔超過 50% 損失 [3]，致病原為髮狀芽梭菌 (*Clostridium piliformis*)，舊名為 *Bacillus piliformis* [4]。離乳兔感受性較高，主要造成離乳 4~8 週齡仔兔大量死亡，剛出生仔兔因為移行抗體反而較少死亡 [8]，遭感染動物發病時通常無症狀而隔日突然死亡，可發現輕微下痢。兔隻解剖可見盲腸黏膜點狀壞死、近端結腸及迴盲腸

交接處水腫及漿膜面出血 [8]。

此兩種疾病對於兔畜牧場及寵物兔均為重要且常見的疾病且可跨物種傳播。在公共衛生上，兩者均有人類曾經感染的病例 [12, 16]，因此在畜牧場經營及人畜共同疾病上都是相當重要的疾病。行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所 (以下簡稱檢定分所) 配合政策實施優良藥品製造規範，生產及供應藥品製造、檢定所需之生醫用清淨紐西蘭大白兔 (New Zealand White rabbit)。本研究係蒐集 2017 至 2021 年檢定分所生醫用清淨兔舍種兔群血清，利用酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 技術分析該兔舍種兔群腦炎微孢子蟲感染症及泰勒氏病血清抗體表現情形。

材料及方法

檢體來源

所有檢體來源取自檢定分所生醫用清淨兔舍，舍內兔隻品種均為紐西蘭大白兔，環境溫度控制在

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

20 - 25°C · 種兔採獨立籠飼 · 年齡分佈為 1 ~ 3 歲 · 種兔公母比例為 1 : 5 · 所有種兔每年定期採血 2 次 · 每次採後肢隱靜脈血液 3 mL · 以 3,000 rpm 離心 10 分鐘 · 取上層血清並保存於 -20°C · 2017 至 2021 年共計採集 1,834 件血液樣本。

酵素連結免疫吸附分析法

應用商品化酵素連結免疫吸附分析套組 (*Encephalitozoon cuniculi* 及 *Clostridium piliformis* Antibody ELISA Test Kit · XpressBio · USA) · 將血清樣本以磷酸鹽緩衝生理鹽水稀釋 50 倍 · 血清及陰陽性對照置於 96 孔盤 · 37°C 作用 45 分鐘 · 移除血清及陰陽性對照 · 清洗液原液 50 倍稀釋後加入 96 孔盤 · 重覆清洗 5 次 · 澈底移除清洗液後加入結合劑 · 於 37°C 作用 45 分鐘 · 移除結合劑並以清洗液重覆清洗 96 孔盤 5 次 · 澈底移除清洗液後加入呈色劑 · 室溫作用 30 分鐘 · 加入終止液 · 以 405 nm 波長吸光值進行判讀。

統計分析

結果數據以 SPSS 統計分析軟體進行分析 · 以獨立樣本 T 檢定 (Independent Sample T test) 進行兩組平均數值間及單因子獨立變異數分析 (The Analysis of Variance · ANOVA) 比較多組間是否有差異性 · 主要分析變數為性別 · 年度及採樣季節 · 分析結果 $P < 0.05$ 則認為在統計學上有顯著差異。

結果

腦炎微孢子蟲感染症抗體在 1,834 件血清檢體中 165 件檢出陽性反應 (9.00%) · 每年血清抗體陽性率在 0.33 ~ 28.17% 之間 (表 1) · 以 2017 年 (28.17%) 為最高 · 和其他年度比較有極顯著性差異 ($P < 0.001$) · 採樣季節以 4 ~ 7 月時陽性率較高 (10.50%) · 有顯著性差異 ($P = 0.012$) · 性別部分 · 種公種母兔陽性率分別為 7.67% 及 9.24% · 無顯著性差異 (表 3)。

泰勒氏病抗體在 1,834 件血清檢體中有 292 件檢出陽性反應 (15.92%) · 每年檢體血清抗體陽性率在 0.33 ~ 42.01% 之間 (表 2) · 以 2018 年 (42.01%)

為最高 · 2017 年及 2018 年陽性率分別和其他年均比較 · 有極顯著性差異 ($P < 0.001$) · 採樣季節部分以 9 ~ 10 月時陽性率較高 (24.54%) · 有極顯著性差異 ($P < 0.001$) · 性別部分種公種母兔陽性率分別為 13.24% 及 16.42% · 無顯著性差異 · 本次研究中 · 免隻泰勒氏病整體血清抗體陽性率 (15.92%) 較腦炎微孢子蟲感染症高 (9.00%) · 其中 31 個檢體同時為二種疾病抗體均為陽性 · 2 個為公兔血清 · 29 個為母兔血清 · 而其中 24 例為陽性檢體於 2017 年檢出 · 6 件在 2018 年檢出 · 1 件在 2021 年檢出。

討論

本次研究檢定分所清淨兔舍種兔腦炎微孢子蟲感染症抗體陽性率為 9% · 遠低於鄭在 2010 年調查臺灣地區免隻腦炎微孢子蟲感染症陽性率 67.8% [2] · 中國 21.9% 及河南部分地區 19.37% [13, 18] · 韓國 22.6% 及日本的 63.5% 及 28.5% [10, 15] · 各地調查腦炎微孢子蟲感染症抗體陽性率可能基於地理位置 · 免隻品種 · 採樣數量 · 檢測方法等各種因素而造成結果差異 · 品種方面 · 文獻結果指出雷克斯兔較紐西蘭大白兔似乎感受性更高 [13, 18] ; 性別方面 · 本次研究結果和 Shin · Meng · Wang 等人在韓國及中國的調查結果一致 · 均無顯著性差異 [13, 15, 18] · 而 Morsy 在埃及的調查結果則是母兔較公兔有更高的發病率及死亡率 [14] · 有趣的是 · 檢定分所公母兔的飼養比例是 1 : 5 · 配種作業時會將公兔移至其他個別母兔籠進行交配 · 故公兔和母兔相比 · 接觸其他免隻的機會更高 · 但並無顯示其染病率有上升的情形 · 此結果和 Bywater 的推論一致 · 幼兔對本病感受性較高 · 5 個月齡以上免隻 · 對於本病具抵抗力 · 此外本病傳染途徑主要經口食入汙染病原孢子的尿液傳播 · 免隻進行交配時生殖系統黏膜接觸非主要傳播途徑 [5] · 可以確定的是 · 有制度化的商業兔養殖場 · 其腦炎微孢子蟲感染症血清抗體陽性盛行率比家庭式養殖場 (household farming) 或寵物兔顯著性較低 · 餵飼單純飼料較餵飼水果 · 蔬菜 · 穀類或是餵飼飼料混合水果與蔬菜之感染率低 [18] · 推測商業兔養殖場有制度化的標準飼育程序 · 環境因子監控 · 專人飼養管理 · 定期

消毒和單一飼料配方等因素，因此設備和環境衛生方面通常會優於家庭式養殖場。另外腦炎微孢子蟲傳播會隨著感染兔隻的尿液散播其孢子而感染其他兔隻，給予水果、蔬菜等方式會增加其尿液汙染食物感染其他兔隻的機會。在採樣季節部分，本次研究腦炎微孢子蟲感染症在 4 - 7 月的血清抗體陽性檢出率較高，和 Meng 調查結果相符 [13]，推測是春夏氣候較暖和且濕度較冬天高，有助於腦炎微孢子蟲孢子傳播。本研究種兔皆獨立籠飼並架高地面 80 公分以集糞尿槽收集排泄物減少尿液噴濺汙染，雖然併排籠架兔隻仍可在最小限度的情形下接觸其他籠兔隻，但已經大大減少兔隻接觸彼此糞尿的情形。另自 2017 年起，檢定分所種兔於腦炎微孢子蟲感染症血清抗體檢出呈陽性時，立即淘汰以減少疾病傳播，配合採用室內高架飼養、特製乾飼料餵飼、定期監測飲用水品質及舍內清潔消毒，是以 2018 年起之血清抗體陽性檢出率均能控制在 3% 以下。

泰勒氏病於兔隻研究文獻多數為病例報告，少見血清學調查研究，鑒於檢定分所曾於 2015 年 6 月發生過一次因泰勒氏病造成近 40% 離乳兔死亡，經過全面性實施 ELISA 及聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction · PCR) 檢測，陽性兔隻立即淘汰及多次舍內以 1~2% 次氯酸鈉及火焰消毒籠架、飼料槽後，於同年 10 月份其兔隻死亡率已控制在 2% 以下 [1]，故本研究針對檢定分所種兔泰勒氏病進行血清抗體追蹤調查，結果顯示種兔泰勒氏病血清抗體陽性率平均為 15.92%，與 Goto 在 1990 年調查日本的兔繁殖場及研究單位內兔隻泰勒氏病抗體陽性率分別為 14.2% 及 17.4% [9] 相近。檢定分所持續定期監測種兔血清抗體、陽性兔隻淘汰解剖及 PCR 檢測，惟至 2017 年卻仍可見 15% 左右血清抗體檢出率，甚至 2018 年血清抗體陽性率不降反升至 42%，然而自 2017 年起現場種兔及離乳兔僅偶見下痢症狀且整體死亡率低於 2%，死亡兔隻進行病理解剖均未見泰勒氏病病徵且 PCR 檢測均為陰性。考量一次性淘汰近半數的種兔恐影響兔隻供應，故 2018 年改變策略，不直接全數淘汰泰勒氏病血清抗體陽性種兔，乃是加強環境消毒

並持續監控兔隻健康狀態及血清抗體，在 2019 年上半年之監測，血清抗體陽性率已降至 8% 左右，之後便一直維持在 2% 以下的抗體陽性率。在採樣季節分析結果顯示，泰勒氏病在 9 - 10 月血清抗體陽性檢出率較高，推測為檢定分所清淨兔舍硬體修繕多為下半年度進行，且 2018 年下半年度曾進行空調箱及除濕機更新工程，造成兔隻緊迫有關。

Espinosa 在 2000 至 2018 年間調查西班牙境內兔形目動物死亡的主因及疾病之前二名，分別為寄生蟲性及細菌性為主，分別為 24.34 及 20.97%，而寄生蟲性疾病中又以腦炎微孢子蟲感染症佔最多數 38.66% [7]，同時參考中國、韓國、日本研究推測腦炎微孢子蟲感染症在全球兔隻身上是普遍且不可輕視的重要疾病。兔隻細菌性疾病多數為伺機性，常伴隨其他緊迫因素發生，如創傷、環境氣候變化、不適當的食物來源、動物運輸、過度擁擠或是惡劣的環境衛生等 [7, 8]，泰勒氏病即是伺機性且致命性細菌性疾病之一，然而檢定分所採用適當的環境控制、畜舍清潔消毒、規範嚴謹的飼養管理及疾病監控下，即可有效控制兔腦炎微孢子蟲感染症及泰勒氏病之血清抗體陽性率。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 106 - 110 年度科技計畫經費提供，以及感謝檢定分所生物藥品檢定研究系協助進行 ELISA 檢驗。

表 1、2017 至 2021 年檢定分所生醫用清淨種兔腦炎微孢子蟲感染症血清抗體陽性隻數

年度	採樣數		採樣數 合計	陽性數		陽性數 合計	陽性率 (%)		總陽性率 (%)
	公	母		公	母		公	母	
2017	79	418	497	19	121	140	24.05	28.95	28.17
2018	66	391	457	2	11	13	3.03	2.81	2.84
2019	62	407	469	1	9	10	1.61	2.21	2.13
2020	59	250	306	0	1	1	0.00	0.40	0.33
2021	24	81	105	0	1	1	0.00	1.23	0.95
合計	287	1,547	1,834	22	143	165	7.67	9.24	9.00

表 2、2017 至 2021 年檢定分所生醫用清淨種兔泰勒氏病血清抗體陽性隻數

年度	採樣數		採樣數 合計	陽性數		陽性數 合計	陽性率 (%)		總陽性率 (%)
	公	母		公	母		公	母	
2017	79	418	497	10	65	75	12.66	15.55	15.09
2018	66	391	457	26	166	192	39.39	42.46	42.01
2019	62	407	469	2	21	23	3.23	5.16	4.90
2020	59	250	306	0	1	1	0.00	0.40	0.33
2021	24	81	105	0	1	1	0.00	1.23	0.95
合計	287	1,547	1,834	38	254	292	13.24	16.42	15.92

表 3、生醫用清淨種兔性別、年度及採樣季節等因子和 ELISA 結果統計分析

	採樣數	腦炎微孢子蟲感染症			泰勒氏病		
		陽性數	陽性率 (%)	P 值	陽性數	陽性率 (%)	P 值
性 別							
公	287	22	7.67	0.082	38	13.24	0.177
母	1,547	143	9.24		254	16.42	
年 份							
2017	497	140	28.17 ^a		75	15.09 ^a	
2018	457	11	2.84 ^b		192	42.01 ^b	
2019	469	9	2.13 ^b		23	4.90 ^c	
2020	306	1	0.33 ^b		1	0.33 ^c	
2021	105	1	0.95 ^b		1	0.95 ^c	
採樣季節							
4-7 月	1,019	107	10.50	0.012	92	9.03	< 0.001
9-10 月	815	58	7.12		200	24.54	
合 計	1,834	165	9.00		292	15.92	

同欄位內多組間有顯著差異者 ($P < 0.05$) 以 a · b · c 表示。

參考文獻

1. 江俊儀、簡佳慶、吳政學、張家禎、葉修如、李淑慧。應用生產醫學技術提升生醫用兔育成率。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告 52: 35 - 43 · 2018。
2. 鄭凱伊。台灣地區兔子感染兔腦炎微孢子蟲之調查。國立嘉義大學獸醫學系研究所碩士論文 · 2010。
3. Allen AM, Ganaway JR, Moore TD, Kinard RF. Tyzzer's Disease Syndrome in Laboratory Rabbits. *Am J Pathol.* 46(5): 859 - 882, 1965.
4. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev.* 11(2): 231 - 266, 1998.
5. Bywater JE, Kellett BS. *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in a specific-pathogen-free rabbit unit. *Infect Immun.* 21(2): 360 - 364, 1978.
6. Ellero N, Lanci A, Avallone G, Mariella J, Castagnetti C, Muscatello LV, Di Maio C, Freccero F. The first case of Tyzzer's disease in a young foal in Italy: a case report. *Vet Ital.* 57(3): 239 - 246, 2021.
7. Espinosa J, Ferreras MC, Benavides J, Cuesta N, Pérez C, García Iglesias MJ, García Marín JF, Pérez V. Causes of Mortality and Disease in Rabbits and Hares: A Retrospective Study. *Animals (Basel).* 10(1): 158, 2020.
8. Ganaway JR, Allen AM, Moore TD. Tyzzer's disease. *Am J Pathol.* 64(3): 717 - 730, 1971.
9. Goto K, Itoh T, Takakura A, Kunita S, Terada E, Kagiya N. A serological survey on *Bacillus piliformis* infection in laboratory rabbits in Japan. *Jikken Dobutsu.* 40(2): 231 - 233, 1991.
10. Igarashi M, Oohashi E, Dautu G, Ueno A, Kariya T, Furuya K. High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *J Vet Med Sci.* 70(12): 1301-1304, 2008.
11. Latney LV, Bradley CW, Wyre NR. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Vet Med.* 6(5): 169 - 180, 2014.
12. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 18(3): 423 - 445, 2005.
13. Meng QF, Wang WL, Ni XT, LI HB, Yao GZ, Sun XL, Wang WL, Cong W. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in China. *Korean J Parasitol* 53(6): 759 - 763, 2015.
14. Morsy EA, Salem HM, Khattab MS, Hamza DA, Abuowarda MM. *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed rabbits in Egypt. *Acta Vet Scand.* 62(1): 11, 2020.
15. Shin JC, Kim DG, Kim SH, Kim S, Song KH. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Korea. *Korean J Parasitol* 52(3): 321 - 323, 2014.
16. Smith KJ, Skelton HG, Hilyard EJ, Hadfield T, Moeller RS, Tuur S, Decker C, Wagner KF, Angritt P. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis. *J Am Acad Dermatol.* 34(2 Pt 2): 343 - 348, 1996.
17. Tyzzer EE. A Fatal Disease of the Japanese Waltzing Mouse caused by a Spore-Bearing Bacillus (*Bacillus Piliformis*, N. SP.). *J Med Res.* 37(2): 307 - 338, 1917.
18. Wang S, Yao Z, Li L, Pan Y, Li P, Nan X, Xie Q, Zhang Z. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* among domestic rabbits in central China. *Parasite* 25(9), 1 - 7, 2018.

Serological surveillance of *Encephalitozoon cuniculi* and *Clostridium piliformis* (Tyzzer's disease) infection in breeding rabbits

CH Wu*, CY Chiang, CC Chang

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

Abstract *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) infection in rabbits is a commonly found zoonotic parasitic disease in Taiwan. Tyzzer's disease (*Clostridium piliformis*) caused fetal epizootic diarrheal disease in rabbits. This study surveyed seroprevalence of *E. cuniculi* and *Clostridium piliformis* in New Zealand White rabbits raised from Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan in Taiwan between 2017 to 2021. The 1,834 serum samples of mature rabbits were collected and tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The serum positive rates of *E. cuniculi* and *Clostridium piliformis* were 165/1,834 (9.00%) and 292/1,834 (15.92%), respectively. There is no gender significant effect in seropositivity rates on both diseases. However, there are seropositivity significant ($P < 0.05$) for *E. cuniculi* in 2017 and sampling in spring to summer. Rabbits had a seropositivity significant ($P < 0.05$) for *Clostridium piliformis* in 2018, 2019 and sampling in fall. The adequate environment condition control and periodical disinfection can effectively decrease seropositive rate in both diseases.

Keywords: Rabbit, *Encephalitozoon cuniculi* infection, Tyzzer's disease, Serological surveillance