

高雄市動物保護處病例報告

山羊李斯特菌症

(Caprine Listeriosis)

李侑俊、馬丞佑、陳威智、孫嘉鴻、李正清、吳倩慈、葉坤松

報告日期：103 年 6 月 25 日

一、前言：

1926 年，英國學者埃弗里特穆雷 (Everitt Murray) 等人從患有敗血症之實驗兔血液中分離出革蘭氏陽性之小桿菌，因發現其使血液內單核白血球增多，最初命名為單核細胞增生菌 (*Bacterium monocytogenes*)，之後為了紀念約瑟夫李斯特 (Joseph Lister) 而將其命名為單核細胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)。

此菌過去長期被認為是一種獸醫病原，屬革蘭氏陽性桿菌，其可存活的环境溫度很廣，在 3~40°C 皆可生長；但最適合溫度為 30~37°C；因較其他細菌易生長於低溫環境 (4~10°C)，可藉由低溫增菌法，延長培養時間而與其他污染細菌分開；pH 值低於 5.6 抑制本菌繁殖。本菌具有由 1~4 根周鞭毛 (peritrichal flagella)，在 30°C 以下的環境中具運動性；而除了以鞭毛運動之外，李斯特菌也能透過細胞內的肌動蛋白絲狀物行聚合作用，藉此在真核細胞的胞漿內進行活動。

李斯特菌症 (Listeriosis) 是重要的人畜共通傳染病，此病的發生廣佈全世界，尤其於群飼動物的國家，如英、美、紐西蘭、澳洲和拉丁美洲國家等國。可感染多種動物，在反芻獸、豬及人的發病特徵為腦幹腦炎，引起綿羊和牛迴旋病和流死產。通常由攝食感染，老年人、孕婦、孩童及免疫系統較弱者為較易感染李斯特菌症之高危險群，其臨床病徵與類似感冒，有發燒、頭痛、失去平衡感，嚴重者可導致死亡。國內雖然無爆發大規模的感染案例，但有鑑於歐美國家近年來因李斯特菌而引起之重大中毒事件逐年增加，且此菌廣泛分佈於自然界中，故李斯特菌不僅為反芻獸重要的疾病，在公共衛生的研究上亦為重要的議題。



二、病歷 (History) :

本病例為高雄市小港區一飼養乳羊場，飼養撒能(Saanen)、奴比亞 (nobin)、阿爾拜因(Alpine)及吐根堡 (Toggenburg) 等品種，總飼養頭數約 700 頭。該場疫苗計畫詳見 Table 1。該場平日除了餵飼牧草外，另餵飼青貯料及酒糟。該場青貯料為自行購買毛豆殼發酵製作，據畜主表示，於 103 年 1 月上旬製作青貯料時，因延遲二日才將毛豆殼堆入青貯槽中，待餵飼該批青貯料後，羊隻出現迴旋運動、吞嚥困難、食慾下降、過度流涎、等症狀，病程後期呈現虛弱無法站立 (Fig. 1)；2 月 6 日製作另一批青貯料時，該批毛豆殼尚未完全解凍就送入青貯槽內，並在一週後即開封餵飼，而餵飼該批青貯料後，羊隻亦發生前述症狀。發病的羊群皆為 1~2 歲齡之擠乳羊，疫情發生期間有注射 amoxicilline 合併退燒藥 (Sulpyrin) 進行治療，並停止擠乳。總計發生率為 2.8 % (20/700)，死亡率為 2.5 % (18/700)，致死率為 90 %。畜主於 2014 年 3 月 19 日通報本處防疫組後，翌日由檢驗組協同防疫組至該場訪視，並對發病羊隻進行剖檢。

三、肉眼病變 (Gross lesions) :

病羊大、小腦的腦溝 (sulcus) 呈現充血 (hyperemia) 之情形 (Fig. 2)。病羊肺臟左側尖、心葉腹側處呈現蒼白斑駁樣，其觸感堅實 (Fig. 3)；其餘肺葉外觀正常。

暫時診斷 (Tentative diagnosis) :

山羊李斯特菌症 (caprinelisteriosis)。

四、實驗室檢驗 (Laboratory examinations) :

(一) 微生物學檢查 (Microbiological examinations) :

1. 細菌分離 (Isolation of bacterium) :

剖檢時，以無菌操作方式自肝臟、肺臟、大腦及脊髓液中進行採樣，以 5 % 脫纖維綿羊血之血液培養基 (Blood agar)、巧克力培養基 (chocolate agar) 及木糖離



胺酸去氧膽酸鹽培養基(XLD agar) 分別置於 4°C 厭氧缸內、25°C 厭氧缸內及 37°C 二氧化碳 (5%) 培養箱內培養 48~72 小時。並無菌落生長。

2. 分子生物學鑑定 (Molecular identification) :

(1) 乳劑製作 (Production of emulsion) :

於病理剖檢時，同時採集腦及肺組織，置於-20 °C 冷凍櫃中 12 小時。檢測時，秤取約 1 克之組織塊加入 9 毫升磷酸緩衝液 (Phosphate buffer solution; PBS) 製成 10 倍乳劑。

(2) 核酸萃取 (Extraction of nucleic acid) :

將乳劑依商業化套組 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®, USA) 所述步驟萃取核酸。

(3) 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) :

將組織核酸利用針對 *L. monocytogenes* 的 *hly A* 所設計的引子對及 *Micoplasma spp.* 的 *mwg* 所設計的引子對 (詳見 Table 2) 進行增幅。總反應體積為 25 μ L，其中含 10 X reaction buffer (eENZYME®, USA)、Taq DNA polymerase 1 U、dNTP 0.2 mM、引子對 (LM1、LM2；MYCP1、MYCP2) 各 0.2 μ M 及 template DNA 50 ng。反應條件詳見 Table 3。預期產物大小為分別為 702 及 400~420base pair (bp) [Aznar&Alarcón, 2003; Anne, 2010]。

(4) 電泳分析 (Electrophoresis analysis) :

將 PCR 產物與 O' SAFE Red 6X Loading Dye (Omics Bio®, Taiwan) 以體積比例 1:5 方式混合後，以 100 伏特、1 % 電泳凝膠 (agarose gel) 將 PCR 產物進行電泳 45 分鐘，於紫外燈箱內觀察，*L. monocytogenes* 與 *Micoplasma spp.* 的結果皆為陰性。

(二) 病毒學檢查 (Virological examinations) :

1. 乳劑製作 (Production of emulsion) :

將腦、肺、肝及淋巴結等臟器，置於-20 °C 冷凍櫃中 12 小時，秤取約 1 克之組織塊加入 9 毫升磷酸緩衝液製成 10 倍乳劑。

2. 核酸萃取 (Extraction of nucleic acid) :

將乳劑依商業化套組 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], USA) 所述步驟萃取核酸。

3. 巢狀聚合酶鏈鎖反應 (Nest polymerase chain reaction; nest-PCR) :

將自腦、肺、肝及淋巴結所萃取之核酸，以引起山羊關節炎腦炎 (Caprine arthritis encephalitis) 之慢病毒 (lentivirus) 的基因 *gags* 所設計之引子對 (詳見 Table 2) 進行增幅，反應條件如下：總反應體積為 25 μ L，其中含 10 X reaction buffer (eENZYME[®], USA)、Taq DNA polymerase 1 U、dNTP 0.2 mM、引子對 (P1、P2) 各 0.2 μ M 及 template DNA 50 ng；反應程序為：pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C、5 分鐘先進行一個循環，denaturation 94 $^{\circ}$ C、30 秒，annealing 55 $^{\circ}$ C、30 秒，extension 72 $^{\circ}$ C、90 秒，此三步驟進行 34 個循環，最後進行一個循環的 final extension 72 $^{\circ}$ C、5 分鐘。再將產物以引子對 (P3、P4) 進行巢狀聚合酶鏈鎖反應 (nest-PCR)，反應條件同第一次聚合酶鏈鎖反應條件。第一次反應產物大小為 296 bp，第二次反應產物大小為 184 bp [Fieniet *al.*, 2002]。

4. 電泳分析 (Electrophoresis analysis) :

將 PCR 產物與 O' SAFE Red 6X Loading Dye (Omics Bio[®], Taiwan) 以體積比例 1:5 方式混合後，以 100 伏特、1 % 電泳凝膠 (agarose gel) 將 PCR 產物進行電泳 45 分鐘，於紫外燈箱內觀察，無產物。

(三) 組織病理學檢查 (Histopathological examinations) :

腦部靠近延髓 (medulla oblongata) 及腦幹 (brain stem) 實質部呈現許多由單核球、淋巴球及漿細胞等單核炎症細胞所構成的多發性局部小膿瘍 (microabscesses) (Fig. 4)，伴隨膠質細胞增生 (gliosis)、神經元尼氏體 (Nissl body) 聚集至細胞質邊緣，呈現中央色質溶解 (central chromatolysis) 現象 (Fig. 5)；實質部呈現區域性的空泡化 (vacuolation)、脫髓鞘 (demyelination) 的情形 (Fig. 6)；於血管周圍則有淋巴球、單核球及漿細胞等單核炎症細胞的圍管現象 (perivascular cuffing) (Fig. 7)。

肺臟於尖、心葉腹側病變處失去正常的肺泡組織結構，其組織間充血 (hyperemia)，並由大量嗜中性球為主的炎症細胞浸潤實質部 (Fig. 8)；於細支氣管或小血管外圍可見大量淋巴球聚集浸潤 (Fig. 9)，而支氣管及細支氣管管腔中含有許多由嗜中性球及壞死細胞碎片所構成的膿性滲出物 (purulent exudate) (Fig. 10)。

(四) 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

本試驗委請行政院農業委員會家畜衛生試驗所協助執行免疫組織化學染色 (immunohistochemistry stain ; IHC)，其染色步驟如下所述。

將腦組織進行固定、脫水、石蠟包埋等步驟製程切片後，以 37°C 熱板隔夜烘烤組織，使其緊密附著於玻片上。將組織切片浸入二甲苯 (xylene) 脫臘 3 次，每次 5 分鐘。使用系列梯度酒精 (濃度依序為 100 %、100 %、95 %、90 %、80 %、60 %) 各缸浸泡 5 分鐘進行水合反應並除去二甲苯，後用蒸餾水清洗玻片。浸泡蛋白酶 K (proteinase K) 15 分鐘進行抗原修復，後用 tris 緩衝液 (tris buffered saline ; TBS) 沖洗。使用 Powerblock® 阻斷液降低非特異性抗原抗體的結合。甩掉阻斷液，滴上 500 倍稀釋的一級抗體 (Polyclonal, 1:500, NOVUS BIOLOGICAL®) 於室溫作用 60 分鐘後，用 tris 緩衝液沖洗。滴上 MACH 3 Probe 覆蓋切片 20 分鐘，後用 tris 緩衝液沖洗。滴上 MACH 3 Polymer 覆蓋切片 20 分鐘，甩掉 MACH 3 Polymer，後用 tris 緩衝液沖洗。使用 Warp Red™ 染色 3 分鐘，後用蒸餾水沖洗乾淨。以 Mayer's haematoxylin 進行對比染色，後用蒸餾水沖洗乾淨，並置入烘箱烘乾，以阿拉伯膠封片，置放隔夜待其風乾。

從 IHC 的結果可見在延髓及腦幹處的小膿瘍，其單核炎症細胞的細胞質內呈現李斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號 (Fig. 11, Fig. 12)；至於圍管現象的單核炎症細胞也呈現出少量的李斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號 (Fig. 13, Fig. 14)。

(五) 青貯料 pH 值測定 (pH of silage determination)

由於發酵不完全之青貯料已食盡，為監控目前場內青貯料的發酵狀況，自青貯槽中，上、中及下層採集青貯料各 50 公克，以 pH 值 7.0 之逆滲透水 100 毫升浸泡 20 分鐘後，測得各層之 pH 值為 4.7、4.53 及 4.53。

五、類症鑑別 (Differential diagnosis)：

李斯特菌症需與會造成神經肌肉系統 (neuromuscular system) 損害的疾病作區分，如山羊關節炎腦炎 (caprine arthritis/encephalitis ; CAE)、鉛中毒 (lead poisoning)、腦灰



質軟化症 (polioencephalomalacia)、妊娠毒血症 (pregnancy toxemia)、狂犬病 (rabies) 及前庭疾病 (vestibular disease)，詳見 Table 4。

山羊關節炎腦炎臨床症狀主要以單肢或雙側後肢彎曲，逐漸變成上行性麻痺，抽搐後死亡，而不會有李斯特菌症迴旋 (circling) 的情形；肉眼病變主要於關節及滑液囊腫大並充滿粉筆樣物質，如有伴隨乳房炎則乳房腫脹且有硬塊，而李斯特菌症則不會有這些肉眼病變；在組織病理學的比較上，山羊關節炎腦炎病變主要出現於中腦 (midbrain) 後段的白質部，有廣泛的淋巴球、單核球的圍管現象，病變區也可見脫髓鞘作用與反應型星狀細胞 (reactive astrocytes) 及格子細胞 (gitter cells) 的出現，而李斯特菌症的病變主要出現於延髓及腦幹，除了廣泛性淋巴球、單核球及漿細胞的圍管現象外，還具有李斯特菌症特殊的多發性局部小膿瘍病灶。

鉛中毒的動物呈現共濟失調 (ataxia)、流涎 (salivation)、眼瞼痙攣性抽搐 (spastic twitching of eyelids)、磨牙 (bruxism)、肌肉震顫 (muscle tremors) 及抽搐 (convulsion)，伴隨腸胃道症狀如食慾不振 (anorexia)、嘔吐 (emesis)、下痢 (diarrhea)、疝痛 (colic) 或暫時性便秘 (transient constipation)；肉眼病變可見大腦皮質 (cerebral cortex) 水腫、鬱血及腦迴扁平 (flattening of the cortical gyri)；組織病理可見神經系統的血管內皮細胞水腫 (endothelial swelling)、大腦皮質呈現層狀壞死 (laminar cortical necrosis) 及水腫 (edema)，而腎臟有腎小管壞死病灶及嗜酸性核內包涵體 (eosinophilic intranuclear inclusion bodies)，在中樞神經的組織病理上，與李斯特菌症有明顯的不同。

腦灰質軟化症臨床症狀上可能有失明 (blindness)、倒臥 (recumbency)、強直性痙攣 (tonic-clonic seizures) 及昏迷 (coma)，有時角弓反張 (opisthotonos) 也可能發生；肉眼病變上可見大腦的腫脹與腦迴扁平；組織病理主要在於大腦皮質的壞死，可見皮質的空泡化、神經元的變性與壞死，血管內皮的腫脹，且病灶可能從大腦皮質延伸至視丘 (thalamus)、紋狀體 (corpus striatum) 及中腦。從組織病理能和李斯特菌症做出類症鑑別。

山羊妊娠毒血症其臨床症狀可見精神沉鬱、食慾不振、呆滯 (sluggishness)、昏睡 (Lethargy)、共濟失調、磨牙 (Grinding of teeth)，病情嚴重時可聞到動物呼出的酮體



(ketones) 味；肉眼病變可見肝臟腫大、變黃，腹腔有脂肪堆積；組織病理主要可見肝細胞呈脂肪變性 (fatty changes)，肝細胞腫大呈現空泡化。於本病歷中該羊無此現象。

狂犬病在山羊呈現頭部顫抖 (head tremors)、具攻擊性及過度興奮 (aggressiveness/hyperexcitability)、牙關緊閉 (trismus)、流涎 (salivation)、磨牙 (Grinding of teeth)、發出聲音 (vocalization) 及倒臥，因此在臨床症狀上與李斯特菌症較不相似；肉眼病變上體表可能有外傷，口腔和咽喉黏膜充出血及潰瘍；組織病理方面在海馬角 (hippocampal horns)、腦幹 (brain stem) 及半月神經節 (gasserian ganglion) 的神經元可能出現具特異性的細胞質內嗜酸性奈格利小體 (Negri bodies)。

前庭疾病的動物常呈現單側自發性的眼球震顫 (nystagmus) 及斜視 (strabismus)，且大部分的動物依然保有機警性及活力，而李斯特菌感染的羊較不會出現眼球震顫及斜視情形；肉眼病變不明顯；組織病理可能在內耳黏膜下層 (submucosa) 有淋巴球浸潤 (lymphocytic infiltration) 的情形。

六、最終診斷(Final diagnosis)：

山羊李斯特菌症 (caprine listeriosis)。

七、處置及預防控制 (Treatment, prevention and control)：

本病例由病史推測應為青貯料處理不當，不完全發酵導致李斯特菌大量增生而引發感染。由於該批青貯料已食盡，目前該青貯槽內有新的青貯料正在製作，故建議畜主須待青貯料熟成後(至少 1 個月)再開封使用。待青貯槽淨空時須徹底消毒，並對舍、飲水器、飼槽、青貯桶及周圍環境實施嚴格的消毒。若再有羊隻發生迴旋運動、過度流涎等神經症狀時，盡快將發病羊隔離，以 amoxicilline 合併 gentamicin 治療。



另針對羊場的青貯料製作進行輔導工作。由於該場受限於場地及經費，非使用太空包或青貯塔而是使用青貯槽，青貯槽頂覆蓋之帆布須注意有無密封完全；空氣的進入可能使青貯料發酵不完全。青貯料製作時間須待其完全熟成再使用，發酵不完全會導致 pH 值偏高，李斯特菌便可能大量增生；每天取用的青貯料須在 25 公分~35 公分之間，如取的青貯料深度太淺，則每日取用皆為因空氣侵入而氧化的變質青貯料。該場使用毛豆藤，其會產生較多的氨及正丁酸，易使 pH 偏高，有利於李斯特菌及黴菌滋生，故青貯料品質及保存性較差，添加甘藷簽或糖蜜等產生可溶性碳水化合物可提供乳酸菌利用生成乳酸，使 pH 值迅速下降至 4.0 以下，改善青貯料的品質。檢測該場現階段青貯料的發酵情形，可見愈接近上層，pH 值愈高，顯示其發酵狀況較中、下層差，故輔導畜主在覆蓋帆布時須盡可能排除空氣及密封，保持厭氧環境以利發酵。

八、疫情追蹤調查 (Follow-up)：

於 2014 年 4 月初電訪畜主，畜主表示該場經畜舍、飲水器、飼槽、青貯桶及周圍環境嚴格的消毒，並在青貯料槽中添加甘藷簽提高碳水化合物比例後，疫情已趨緩，無羊隻發生神經症狀等情形。針對該場半徑 5 公里的 6 場畜牧場進行訪視，皆無疫情發生。

九、討論 (Discussion)：

1. 病因及可能的致病機制

L. monocytogenes(以下簡稱李斯特菌) 為本病例的主要病原，是一重要的人畜共通傳染病，革蘭氏陽性桿菌，屬厚壁菌門 (Firmicutes)、芽孢桿菌目 (Bacillales)、李斯特菌屬 (Listeria)，本菌屬包含六種菌種，包括 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*，而人感染主要幾乎所有病例都由 *L.monocytogenes* 引起；*L. ivanovii* 主要感染反芻獸，引起綿羊流產，偶發於牛隻。對 *L.monocytogenes* 感



受性最強之動物為綿羊、其次為山羊和牛；亦可感染其他物種，包括家畜、鳥禽及嚙齒動物，特別是鼠類常成為本菌帶原宿主；兔子及天竺鼠曾有爆發引起敗血症記載。

李斯特菌長約 1~2 μm ，寬約 0.5 μm ，可生長於血液培養基並產生不完全溶血環；在培養在胰蛋白胨培養基(Tryptose agar)時，菌落型態為細小呈圓形 (直徑小於 1mm)、邊緣完整平滑、略為平坦的菌落，在自然光下呈乳白色，而在透色光下則為特有的藍綠色。李斯特菌為環境中的常在菌，野生或畜養的動物、鳥類、昆蟲、土壤、廢水及植物上皆有被分離的報告；此菌可長時間存在人類、鳥禽的腸道而不引起任何症狀，有文獻指出 5%的健康人類的腸道可分離出此菌。感染本菌的反芻動物會出現各種神經障礙，雞隻則是呈現壞死性心肌炎伴隨心包囊積水、腹水及敗血症之病變。如果菌只在腸內，家畜就不會發病 [Low & Donachie, 1997]。

青貯料的原理是在適宜的條件下，通過厭氧發酵，產生酸性環境，抑制有害微生物的繁衍，從而達到保存飼料的目的。李斯特菌可增殖於在 pH 9.6 的環境，但在 pH 5.6 以下的環境可抑制本菌生長；完善的青貯料的製作，可使青貯槽內環境維持在 pH4.2 以下，此種酸度可抑制李斯特菌及大部分細菌的生長，亦可降低酵素活性，使青貯料之養分得以保持。本病例可由病史得知該場在疾病爆發前曾發生青貯料處理不當的問題，毛豆殼腐敗後才移入青貯槽內發酵，後又置入未解凍之豆殼，發酵時間過短 (僅三天就開封)，低溫又高 pH 值的環境皆利於李斯特菌的生長；後續針對場內正在餵飼之青貯料 pH 值檢測亦偏高的情況，故推斷本病的病因緣自於李斯特菌大量增生汙染了青貯料，進而引起本病的發生。

李斯特菌的致病機制，目前證據顯示為食入感染。單純食入被汙染的青貯料並不足以造成動物中樞神經性的疾病，動物的口腔黏膜、舌頭若被植物的枝條或尖銳物刺傷時，在口腔增殖的李斯特菌可經粘膜傷口感染，細菌自傷口進入黏膜下的結締組織，之後自鄰近的神經末梢侵入神經細胞內，順著三叉神經，藉由軸突運輸逆行至腦幹。本菌能順利進入宿主細胞是由其表面蛋白 *Internalin A* 與宿主上皮細胞的跨膜蛋白—鈣黏著素 E (E-cadherin) 結合，再經由胞飲作用將李斯特菌包覆成液泡帶入細胞質中。李斯特菌藉由分泌 *listeriolysin O* 與 *phosphatidylinositolspecificphospholipase C* (PI-PLC) 兩種溶血性毒素和酵素將液泡的膜打破，其釋放至細胞質內，另外 *listeriolysin O*



亦可抑制細胞的免疫反應，使細菌能自由的在胞漿中活動並進行複製，細菌量可增加 1 倍僅需大約 1 小時。當細菌量增加到一定程度時，細菌表面的蛋白 *actA* (*surface protein actA*) 可誘導宿主細胞的球狀肌動蛋白 (globular actin) 分子，進行聚合作用形成絲狀肌動蛋白 (actin filaments)，這些絲狀肌動蛋白就像推進器尾巴 (propulsive tail) 附在細菌的一端，將細菌複推進移動到細胞膜，細胞膜向外突出形成偽足，再利用偽足被相鄰的細胞吞噬而感染鄰近的細胞。起初本菌在腦細胞內並不會傷害血腦障壁 (blood brain barrier)，故不會引起先天或後天免疫反應，且可藉由細胞內移動來規避吞噬細胞的防禦機制。李斯特菌最終定居在腦幹 (橋腦，延髓和頸段近端的脊髓)，利用調控子 (mediator) 與分解酶 (degradative enzyme) 使腦幹的細胞死亡，當其傷害到微血管內皮時，才引發炎症反應，此時血腦障壁瓦解，嗜中性球大量聚集於血管壁四周，形成化膿灶，造成腦幹腦炎 [林，2004；Oevermann, 2010]。

2. 傳播途徑與流行病學調查

李斯特菌廣泛分佈於自然界，常發現於土壤、腐生植物和許多哺乳動物糞便中，野鼠、臭鼬可能為此菌的保毒者 [潘和蔡，2005]。無論是動物或是人類，食入遭李斯特菌污染的食物為其主要的傳染途徑，在草食動物最常見的即是青貯料的污染；研究指出爆發李斯特菌感染的羊場，其青貯料中每公斤有超過 10^7 菌落形成單位 (CFU, colony-forming unit) 的細菌數 [Fenlon, 1986]。人的感染途徑則是食入易受污染的食物包括蔬果、生乳、乳酪、肉品、熱狗、魚蝦及冰淇淋等。其他傳染模式包括母子垂直感染 (經由胎盤)、分娩時經由生殖道感染、醫院嬰兒房內交叉感染及使用污染的嬰兒洗澡用礦物油為感染途徑。另外局限性皮膚感染特別易發生於直接接觸流產仔牛和感染家禽的農場畜主或獸醫。然而大部分爆發流行及散發病例還是與食品污染有關。本例羊場位於小港區的東側，四面環山，僅一對外出入口，在防疫上得其先天之利，然而李斯特菌為食入為主，病史中得之有青貯料處理不當的情況，又其半徑 5 公里內的羊場及使用相同毛豆殼來源的牧場皆無疫情發生，故排除青貯原料污染的可能。

在英國，綿羊是最常爆發感染李斯特菌的物種，自 1980 年起即有零星的案例發生；0.1~13.3% 的腦炎病例為感染本菌所致 [Wilesmith and Gitter, 1986]。此病少見於 6



週齡以下的仔羊，除此之外並無好發的年齡；Barlow 認為此病好發於 4 月齡以上的仔羊或 2 歲齡以上的成羊 [Barlow and McGorum, 1985]，然而 Green 等人的報告卻指出此病常發生於 6~8 週齡的仔羊 [Green and Morgan, 1994]。本病例發病羊群皆為 1~2 歲齡的乳羊，6 週齡以下的仔羊並未餵飼青貯料，故飼料的選擇為造成發病年齡的因素。此病的發生有季節性，大多數的腦炎病例皆出現在 2~3 月間，推測與母羊懷孕末期免疫力改變與青貯料的使用季節有關[Anon., 1983]。本病例發生的時間為 1~2 月，此時為高雄地區月均溫最低的月份 (19.5°C)，推測低溫造成發酵不完全，再加上牧場青貯料的處理不當而引起李斯特菌症的爆發。

在人的相關報告，1983 年歐洲(德國、英國、瑞士、丹麥和法國等) 與美國即有許多食物媒介的報告，拉丁美洲國家(墨西哥及阿根廷)亦有散發病例 [林，2004]；美國近 5 年每年通報 750~900 例，在 1998~1999 年、2000 年及 2002 年皆發生橫跨 10 多州的大規模流行事件[CDC, 1999; Frye *et al.*, 2002]，分別造成 108、30 及 54 人感染。加拿大每年約 100~140 例，2008 年發生大規模致死性爆發流行事件，確診 57 例、死亡 23 例 [Elizabeth, 2011]。藥物食品檢驗局於 2002 年針對台灣東部地區市售即食魚貝類食品進行調查，李斯特菌檢出率為 11.0% [胡等，2002]；我國衛生福利部 (舊稱衛生署) 於 1991 年 9 月 17 日將李斯特菌公告為食物中毒原因菌，自 1997 年至 2007 年新生兒感染李斯特菌症共有 14 例，至 2012 年為止皆有零星的案例發生，感染者大多為老人及孕婦，因食入汙染之生菜或乳製品而發病，其中最嚴重的污染事件為 1997 年 10 月國內發生醉爾斯 (Dreyer's) 冰品污染事件，14 件抽驗樣品中有 5 件被檢出，衛福部請該公司對其不符規定之產品即刻進行全面回收及銷毀。最近一次的病例出現在 2012 年，2 名孕婦疑似吃到汙染的生菜、肉及軟乳酪而感染，之後再傳染給胎兒案例。

3. 診斷及血清學的研究

懷疑李斯特菌感染時應進一步作實驗室診斷，使用一般的培養基不太容易鑑定本菌，但目前已有商品化的選擇性鑑定培養基。衛生福利部於今年初公告「最新食品微生物之檢驗方法—單核球增多性李斯特菌之檢驗」方法，將檢體與費氏培養液 (Fraser broth) 以體積 1:9 的比例先行增菌培養，之後以改良式牛津培養基 (Modified Oxford



medium, MOX) 進行分離培養，最後以即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 作最終菌種的鑑定。本病例並無分離到此菌，推測其原因包括剖檢羊隻已使用抗生素治療一週，且根據病理切片的炎症細胞相顯示病程已持續一段時間，再加上剖檢時僅自大腦部位與腦脊髓液進行細菌分離，造成無法分離到此菌。

當發生由食物媒介引起高燒及胃腸炎病例，行培養為陰性時，血清學檢查 (由 *listeriolysin O* 所產生之抗體) 則對回溯性鑑定有所幫忙。針對李斯特菌引起的腦幹的膿瘍亦可透過核磁共振攝影 (magnetic resonance imaging, MRI) 與電腦斷層攝影 (computed tomography, CT) 作診斷。其他實驗室診斷技術包括免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)、原位雜合 (in situ hybridization, ISH) 及脫氧核糖核酸探針 (DNA probe) 等皆可作為診斷的工具，本病例最終亦藉由免疫組織化學染色法確診。聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多型性 (PCR-RFLP)、脈衝式膠體電泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 等分子型別分類技術可做為細菌血清型別鑑定和流行病學調查 [蔡等, 2009]。美國 CDC 於 1988 年將 *L. monocytogenes* 列入 Pulsenet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>)，此系統有效提供李斯特菌爆發早期檢測。

李斯特菌屬根據其存在之細胞體抗原 (O antigen) 及鞭毛抗原 (H antigen) 的不同，可再細分不同之血清型。血清型 1、3、4 的分類是根據細胞體抗原，而血清型 2 的分類則根據獨特的鞭毛抗原。李斯特菌之血清型分佈如 Table 5。李斯特菌共有 16 種血清型，造成人類發病的血清型主要以 4b、1/2a、1/2b 為主；多數人類李斯特菌症病例屬於血清型 4b，然而於食品中最盛行之血清型則為 1/2a；而血清型 4b、1/2a、1/2b 及 3 則是最常從發病動物分離異 [潘和蔡, 2005; Jones & Seeliger, 1991]。

4. 治療與處置

抗菌劑治療以 ampicillin 與 amoxicillin 為第一優先考慮的藥物，有報告指出此 2 種抗菌劑可有效控制此菌的感染 [Hof, 1991]，然而在綿羊已出現腦炎的病例中，其治癒的機會並不高。Ampicillin 或 penicillin 合併 gentamicin 有相加成的效果，在人的李斯特菌感染症為首選治療用藥 [MacGoan *et al.*, 1990; Hof, 1991]。Penicillin 亦可使用，但



若 penicillin 過敏或不耐，最好改選 TMP/SMX (trimethoprim-sulfamethoxazole)。Vancomycin 也可使用於李斯特菌的治療，但有治療失敗的報告 [Temple & Nahata, 2000]。Imipenem 及 meropenem 也有效，但要小心抽搐的副作用 [Nauet *al.*, 1998]。Cephalosporin 在體外的試驗可殺滅李斯特菌，然而在動物體上的治療效果不盡理想，其他如 Tetracycline、Erythromycin、Chloramphenicol、Clindamycin 及 Quinolone 等，雖然並無發現抗藥性菌株，但臨床上的療效不佳，應避免使用 [Cherubin *et al.*, 1991]。

不論是否有腦膜炎，均建議使用腦膜炎的劑量。單純菌血敗血症僅需治療 14 天，但臨床上仍需要根據病人的臨床狀況來調整，若有腦膜炎的症狀皆應治療 21 天。可能之併發症有心內膜炎及腦膿瘍，前者應治療 4~6 週，後者則最少需治療六週，並定期追蹤腦斷層檢查。李斯特菌症的病徵因人而異，一般在進食感染此菌後大約 12 小時內，會出現如罹患感冒的症狀及發燒、頭痛或腸胃不適 (例如嘔吐、腹瀉等)。李斯特菌症雖不多見，但死亡率高達 30~35%，在免疫受損的病人死亡率更可達 42%。癌症病人併發李斯特菌症若能即時治療，其預後為良好。本菌感染孕婦，在懷孕前期會經由胎盤感染胎兒會危及胎兒，導致流產、早產或死胎，造成胎兒 100% 死亡率。；懷孕後期才受感染通常症狀較輕微，但分娩時胎兒會受到產道感染，可能在出生後一至四星期會出現細菌性腦膜炎。

5. 公共衛生

李斯特菌是一重要的人畜共通傳染病原，老年人、新生兒、孕婦、免疫系統機能較弱者、長期服用腎上腺皮質類固醇之患者或長期接受血液透析者、癌症、糖尿病、愛滋病、及腎臟疾病患者為較易罹患之高危險群，感染劑量介於 $10^2 \sim 10^9$ (CFU/g)，視個體免疫系統強弱而定。臨床病徵與類似感冒，有發燒、頭痛、冷顫、背痛、失去平衡感、頸部僵直等症狀，此外亦可能併發腎盂炎、菌血症、腹膜炎，嚴重者可導致死亡，死亡率約 25~30%。

李斯特菌可經由昆蟲、鼠類、飼料及糞便之媒介傳播而污染蔬果、肉品、生乳、魚、蝦及甲殼類等食品，而在加工的過程中，污染或消毒不完全的器具與環境更會造



成本病的爆發。本菌的感染主要是因食入遭李斯特菌污染的食物，故食用肉類務必煮熟、不要喝生的牛奶，蔬菜、水果須清洗乾淨，生食和熟食應分開處理。在一般食品加工廠可用具有抑制李斯特菌作用之化合物包括：碘化合物、氯或四級胺(200ppm) 來抑制李斯特菌。在美國有 20%~65% 食因性感染的死亡案例是因李斯特菌污染所引起，因此早期偵測爆發流行和確認感染源為防治之首要，Pulsenet 系統有效提供李斯特菌爆發早期檢測，而「危害分析重要管制點」(Hazard Analysis Critical Control Point，簡寫為 HACCP) 系統則可用來監測及管制李斯特菌的危害。

畜牧業者應加強農舍清潔及定期追蹤牛、羊的健康狀況，並於接觸過動物後要加強洗手，尤其在碰觸流產的動物屍體後更要徹底做好消毒工作，家中若有孕婦和免疫功能不全的人應採取更嚴格的預防措施，避免李斯特菌的感染。

十、誌謝

本報告承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所、國立嘉義大學獸醫學系詹昆衛老師實驗室提供諸多寶貴意見與協助，僅此致謝。

十一、參考文獻

1. Anne E. Survival of mycoplasma species in recycled bedding sand and possible implications for disease transmission to ruminants. Master of science. Utah State University, Utah, 2010
2. Anon. Listeria infections in farm animals. Veterinary Record. 112(14): 314, 1983.
3. Aznar R, Alarcón B. PCR detection of Listeria monocytogenes: a study of multiple factors affecting sensitivity. J Appl Microbiol. 2003;95(5):958-66.
4. Barlow RM, McGorum B. Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. Vet Rec 116(9):233-236, . 1985.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of listeriosis-United States, 1998-1999. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 47:1117-1118, 1999.
6. Cherubin CE, Appleman MD, Heseltine PN, Khayr W, Stratton CW. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. Rev Infect Dis 13(6):1108-1114, 1991.



7. Elizabeth BU. The 2008 Canadian listeriosis outbreak:a result of knowledge ignored. MUMJ8(1), 65-67, 2011
8. Fenlon DR. Growth of naturally occurring *Listeria* spp. in silage: a comparative study of laboratory and farm ensiled grass. Grass and Forage Science41(4): 375-378, 1986.
9. Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, Buruoca C, Oppenheim S, Anderson G, Murray J, BonDurant R.Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection.Theriogenology 57(2):931-940, 2002.
10. Frye DM, Zweig R, Sturgeon J, Tormey M, LeCavalier M, Lee I, LawaniL, Mascola L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated withdelicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. Clin Infect Dis35(8):943–949, 2002.
11. GreenLE, MorganKL. Descriptive epidemiology of listerialmeningoencephalitis in housed lambs. Preventive Veterinary Medicine 18(2): 79-87, 1994.
12. Hof H.Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis.Infection19(4):229-233, 1991.
13. Hwu CH, Shyu JF, Kuo LP. Investigation on *L. monocytogenes* Contamination inReady-to-Eat Fishery Products in Eastern Taiwan. Ann Rept. NLFD Taiwan R.O.C (20): 284-288, 2002.
14. Jones D, Seeliger HPR. The Genus *Listeria*. In: The Procaryotes, Vol II, 2ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M. et al., (ed), Springer-Verlag,1598-1616, 1991.
15. Low JC, Donachie W.A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis.Vet J153(1):9-29, 1997.
16. MacGowan AP, Holt HA, Reeves DS.In-vitro synergy testing of nine antimicrobial combinations against *Listeria monocytogenes*.J AntimicrobChemother25(4):561-566, 1990.
17. Nau R, Lassek C, Kinzig-Schippers M, Thiel A, Prange HW, Sörgel F. Disposition and elimination of meropenem in cerebrospinal fluid of hydrocephalic patients with external ventriculostomy. Antimicrob Agents Chemother42(8), 2012-2016, 1998.
18. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandavelde M..Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in human andruminants: A zoonosis on the rise? InterdiscipPerspect Infect Dis,2010.
19. Temple ME,Nahata MC. Treatment of listeriosis. Ann Pharmacother34(5):656-661, 2000.
20. Wilesmith JW, Gitter M.Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain.Vet Rec119(19):467-470, 1986.



21. 行政院衛生署疾病管制局。李斯特菌症延伸參考資料。
www2.cdc.gov.tw/public/Attachment/171811522871.pdf
22. 李崇道：神經系統，獸醫病理學。823-896 頁。2006。國立編譯館 / 黎明文化事業公司
23. 林世仁。單核細胞增多性李斯特菌之特性與檢驗。碩士論文。國立中山大學生物科學系碩士在職專班。1-78，2004。
24. 胡仲勳、徐錦豐、郭荔平。台灣東部地區市售即食魚貝類食品李斯特菌污染之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 (20)，284-288，2002。
25. 潘銘正、蔡向榮。李氏菌症。引自：簡明獸醫傳染病學，第二版。藝軒圖書出版社，台北，38-39，2005。
26. 蔡睦宗、張淑美、曾祥洸、李聰明。第三十六章李斯特菌症。引自人畜共通傳染病臨床指引，第二版。行政院衛生署疾病管制局，台北，159-163，2009。

Table 1 Vaccines plan of caprines in affected farm.

Times	Vaccines
February	Foot and mouth disease (O-Taiwan:O-Manisa)
July	Sheep pox and goat pox (Capripoxvirus)

Table 2 Primers used in this study.

Target	Primer	Sequences (5' to 3')	Size of product (bp)
<i>hly A</i>	LM1	cctaagacgccaatcgaa	702
	LM2	aagcgcttgcaactgctc	
<i>mwg</i>	MYCP1	acaccatgggagctggaat	400~420
	MYCP2	cttcacgactttcagacccaaggat	
<i>gag</i>	P1	caagcagcaggaggagaagctg	296
	P2	tctacccccataattgatccac	
<i>gag</i>	P3	gttccagcaactgcaaacagtagcaatg	184
	P4	acctttctgcttctcatttaatttccc	

Table 3 Programs of polymerase chain reaction.

Target	Dnaturation	Annealing	Extension	Cycle
<i>L. monocytogenes</i>	94°C 30 sec.	55°C 45 sec.	72°C 45 sec.	35
<i>Micoplasma spp</i>	95°C sec.	°C sec.	°C sec.	

Table 4、鑑別診斷

病因	臨床症狀	肉眼病變	組織病理
山羊關節炎/腦炎	單後肢或雙後肢彎曲，逐漸形成上行性麻痺	關節及滑液囊腫大並充滿粉筆樣物質	中腦後段白質部有圍管現象、脫髓鞘及神經膠質細胞增多現象
鉛中毒	共濟失調、流涎、眼瞼痙攣性抽搐、磨牙、肌肉震顫、抽搐、食慾不振、嘔吐、下痢、疝痛、暫時性便秘	大腦皮質水腫、鬱血、腦迴扁平	神經系統的血管內皮細胞水腫、大腦皮質呈現層狀壞死及水腫，腎臟有腎小管壞死病灶及嗜酸性核內包涵體出現
腦灰質軟化症	失明、倒臥、強直性痙攣及昏迷，有時有角弓反張情形	大腦腫脹與腦迴扁平	大腦皮質的壞死，可見皮質的空泡化、神經元的變性與壞死，血管內皮的腫脹，且病灶可能從大腦皮質延伸至視丘、紋狀體及中腦
山羊妊娠毒血症	精神沉鬱、食慾不振、呆滯、昏睡、共濟失調、磨牙，病情嚴重時可聞到動物呼出的酮體味	肝臟腫大、變黃，腹腔有脂肪堆積	肝細胞呈脂肪變性，肝細胞腫大呈現空泡化
狂犬病	頭部顫抖、具攻擊性及過度興奮、牙關緊閉、流涎、磨牙、發出聲音及倒臥	可能有外傷，口腔和咽喉黏膜充血及潰瘍	海馬角、腦幹及半月神經節的神經元可能出現具特異性的細胞質內嗜酸性奈格利小體
前庭疾病	單側自發性的眼球震顫及斜視，且大部分的動物依然保有機警性及活力	肉眼病變不明顯	組織病理可能在內耳黏膜下層有淋巴球浸潤的情形。

[http://www.merckmanuals.com/vet/generalized_conditions/listeriosis/overview_of_listeriosis.html#top]



Table 5 Serotype of *Listeria spp.*

species	serotype
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. innocua</i>	3, 6a, 6b, 4ab, U/S*
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4c, 4d, 6b, U/S*
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b, U/S*

(Jones & Seeliger, 1991)

(* U/S, undesignated serotype.)



Fig. 1 臨床上病羊呈現迴旋的神經症狀。



Fig. 2 大、小腦的腦溝呈現充血之情形。

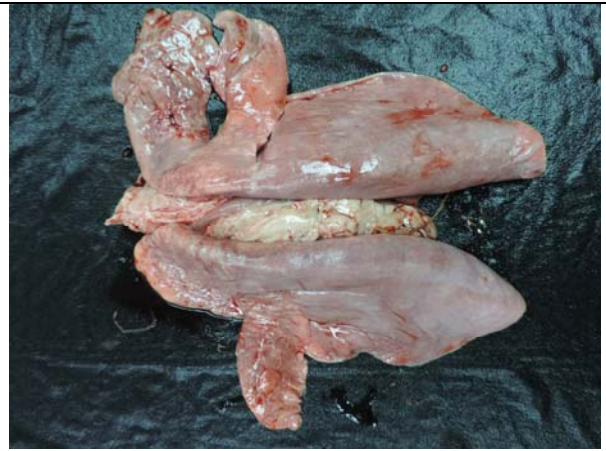


Fig. 3 肺臟左側尖、心葉腹側處呈現蒼白斑駁樣，其觸感堅實。

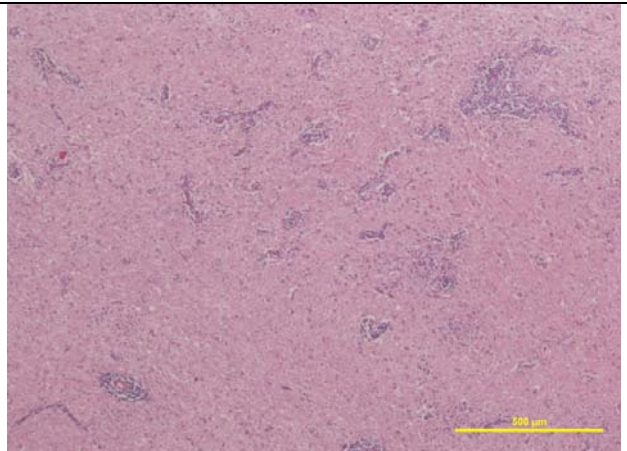


Fig. 4 延髓及腦幹實質部呈現許多由單核球、淋巴球及漿細胞構成的多發性局部小膿瘍。

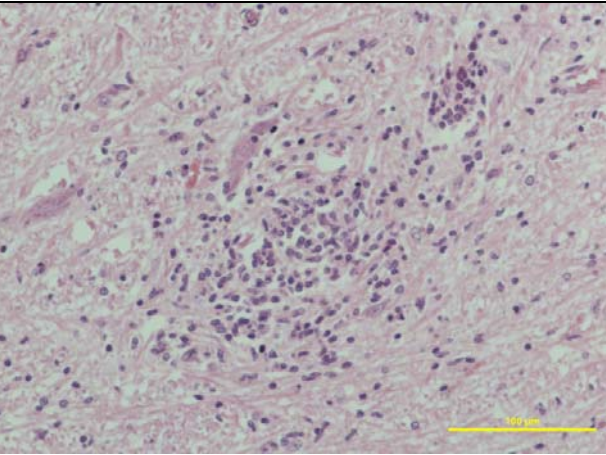


Fig. 5 膠質細胞增生、神經元呈現退行性變化。

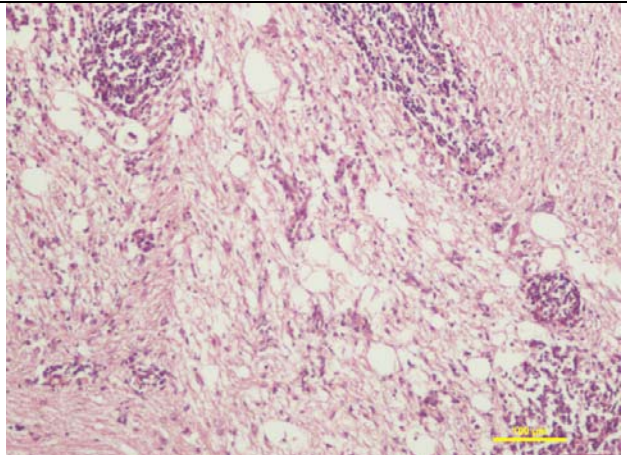


Fig. 6 實質部呈現區域性的空泡化、脫髓鞘的情形。

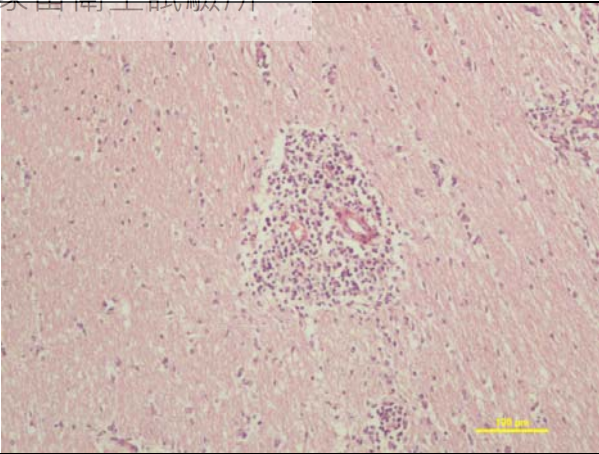


Fig. 7 血管周圍有淋巴球、單核球及漿細胞的圍管現象。

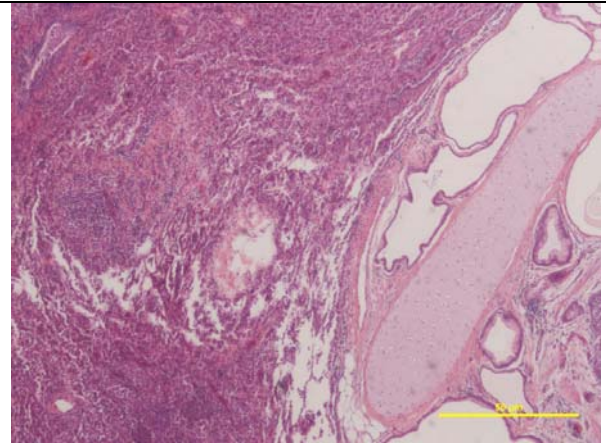


Fig. 8 肺臟於尖、心葉腹側病變處失去正常的肺泡組織結構，其組織間充血，並由大量嗜中性球為主的炎症細胞浸潤實質部。

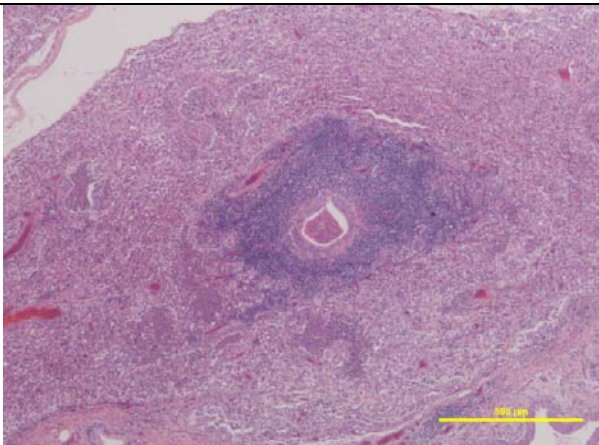


Fig. 9 於細支氣管或小血管外圍可見以大量淋巴球為主的炎症細胞聚集浸潤。

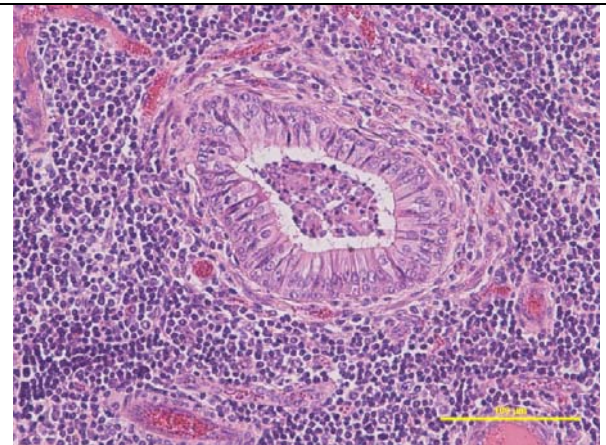


Fig. 10 細支氣管管腔中含有許多由嗜中性球及壞死細胞碎片所構成的膿性滲出物。

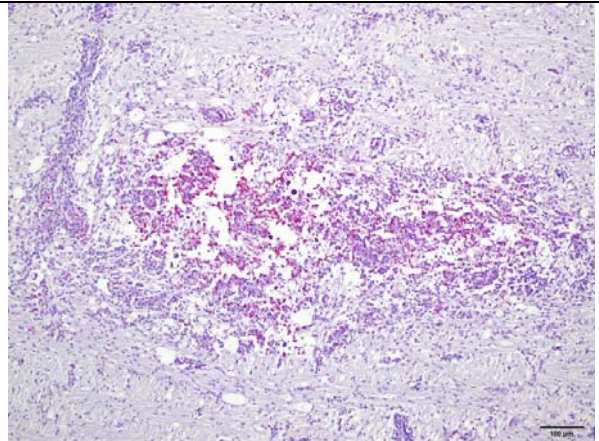


Fig. 11 延髓及腦幹處的小膿瘍，其單核炎症細胞的細胞質內呈現李斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號。

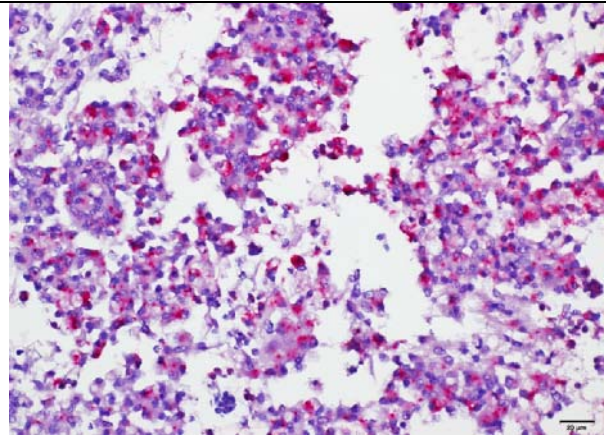


Fig. 12 延髓及腦幹處的小膿瘍，其單核炎症細胞的細胞質內呈現李斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號。

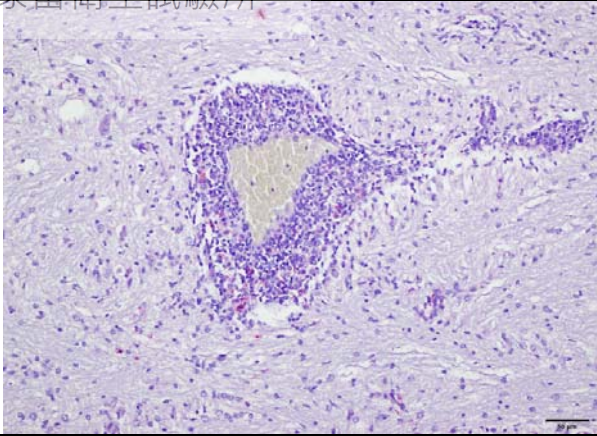


Fig. 13 圍管現象的單核炎症細胞呈現出少量的李
抗原陽性反應的紅色訊號。

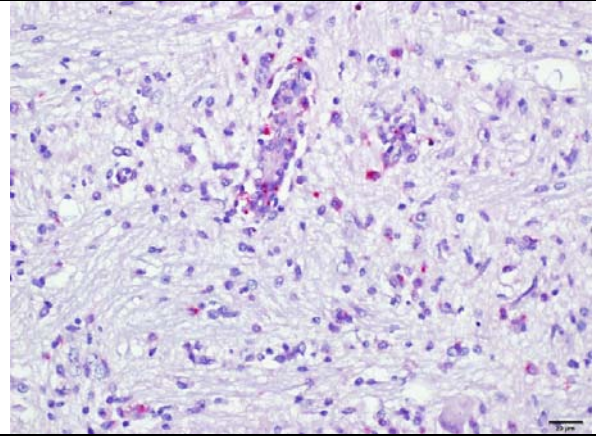


Fig. 14 圍管現象的單核炎症細胞呈現出少量的李
斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號。