



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

103年第一次強化動物疾病 檢診體系會議

題目：山羊李斯特菌症
單位：高雄市動物保護處

李侑俊、馬丞佑、陳威智、孫嘉鴻、
李正清、吳倩慈、葉坤松



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

大網

一、前言。

二、本病例報告。

三、後續疫情追蹤調查。

四、討論。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

前言

3

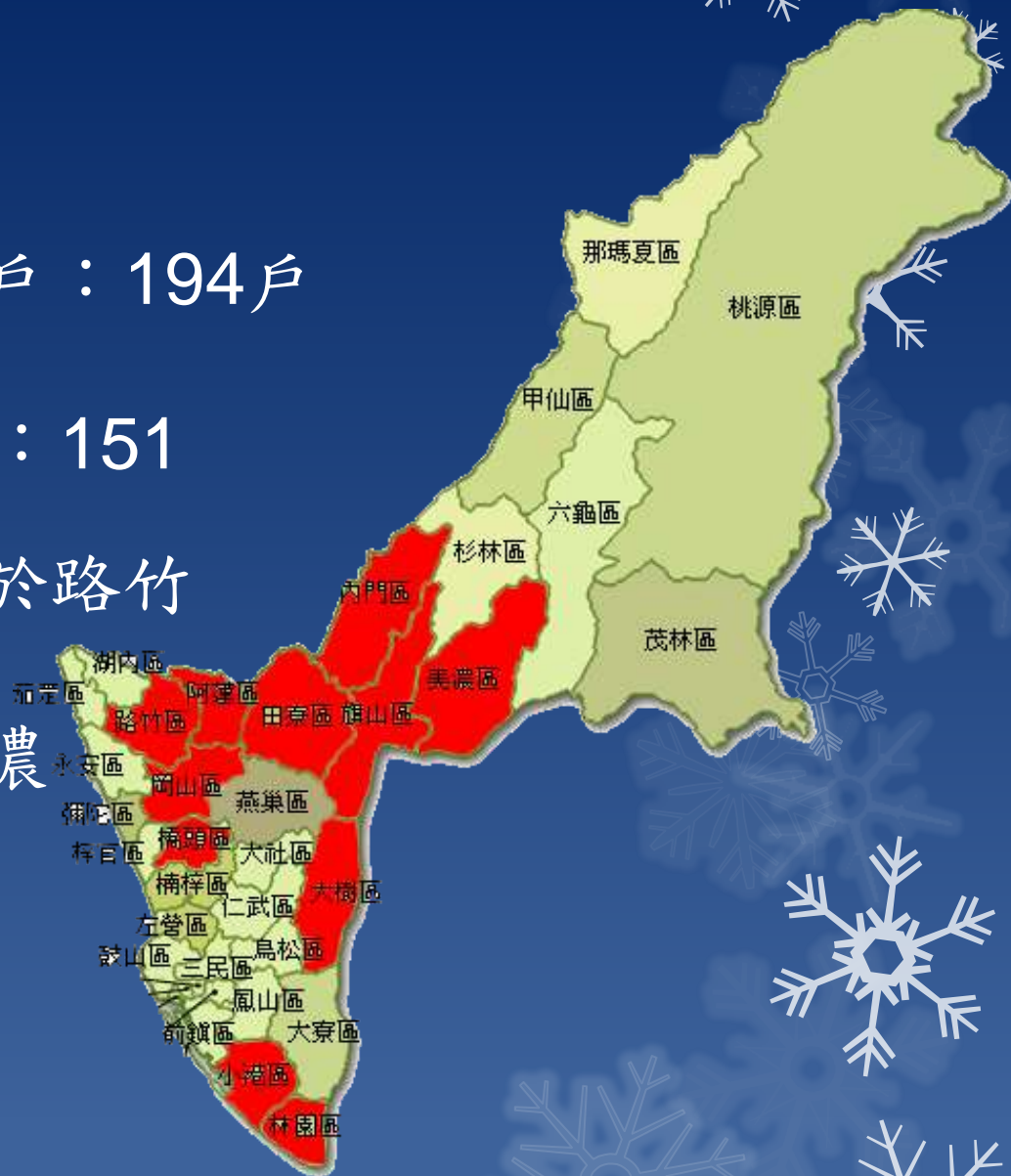




行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

前言

- ✧ 高雄市目前養羊戶：194戶
- ✧ 乳羊：43；肉羊：151
- ✧ 乳羊場主要集中於路竹、岡山、田寮、旗山、內門、美濃、大樹及橋頭區



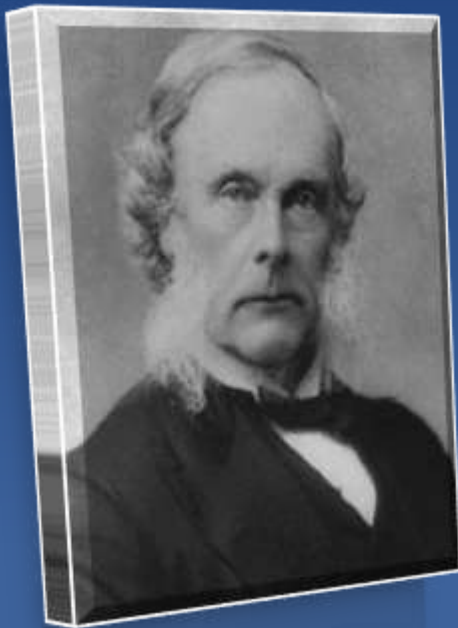


Listeria monocytogenes

✧ Everitt Murray, 1926

✧ 實驗兔，血液內單核白血球增多

→ *Bacterium monocytogenes*



✧ Joseph Lister

→ *Listeria monocytogenes*



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

6

Listeria monocytogenes

- ✧ 曾經被認為是一種獸醫病原菌
 - 綿羊、牛迴旋病和流死產
- ✧ 感受性最強之動物為**綿羊**、其次為山羊和牛
- ✧ 老年人、孕婦、孩童及免疫系統較弱者
 - 發燒、頭痛、失去平衡感，死亡率約
25~30%



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

7

Listeria monocytogenes

- ✧ 藥物食品檢驗局的檢驗報告 (2002) :
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 %
- ✧ 成大醫院 (2012) :
2例孕婦感染再傳染給胎兒造成死亡



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

8

病例報告



行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況





行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況

本病例場位於小港
區一乳羊場，四面
環山，僅一出入口。





行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況

- 本病例場共有五棟羊舍，目前使用有四棟
- 自製青貯料，有三個發酵槽





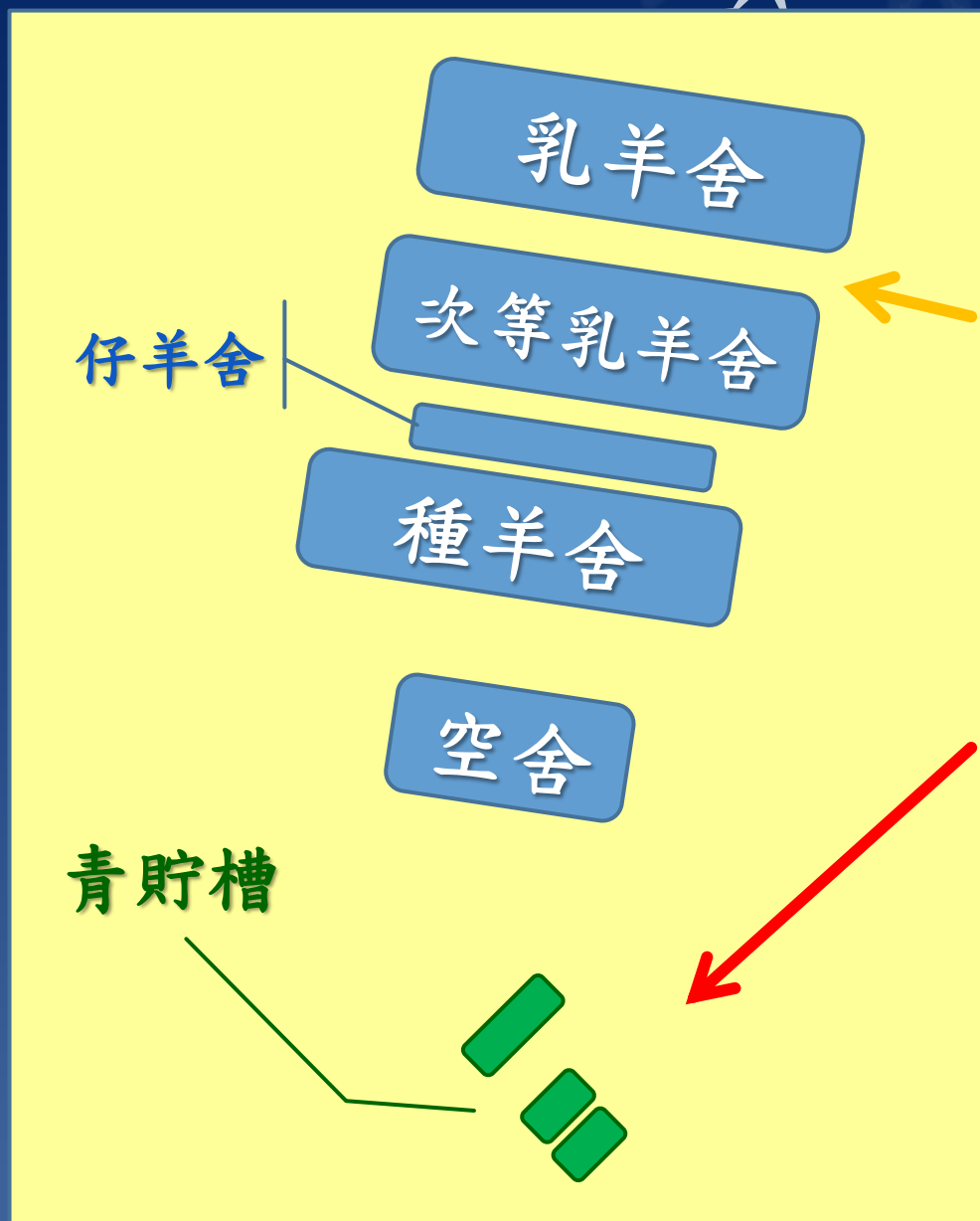
行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況

- 本病例場共有五棟羊舍，目前使用有四棟
- 自製青貯料，有三個發酵槽





行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

AHRI





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



牧場概況

本病例場為飼養
撒能、奴比亞
阿爾拜因及吐根
堡等品種，總飼
養頭數約700頭



行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況

- 畜舍乾淨、通風、採光良好
- 每週定期消毒一次
- 二月：口蹄疫疫苗
七月：羊痘疫苗
- 結核病(-)、布氏桿菌(-)





行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHR

牧場概況

- 自然交配 (4月、10月)
- 使用青貯料、酒糟、新鮮牧草配合精料餵飼
- 最近五年內羊群健康情況良好並無任何重大疾病發生





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

病 歷

17

- ✧ 103年1月初，購入毛豆殼在外曝曬二日後才堆入青貯槽發酵，當時毛豆殼已出現腐敗現象
- ✧ 餵飼該批飼料一星期後，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
- ✧ 畜主自行注射 **amoxicilline + sulpyrin** 進行治療，並停止擠乳



病 歷

- ✧ 2月初，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
- ✧ 餵飼該批飼料後，亦發生前述神經症狀



- ✧ 發生率為2.8 % (20/700)
死亡率為2.5 % (18/700)
致死率為90 % (18/20)



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

病 歷

✧ 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採樣



AHRI

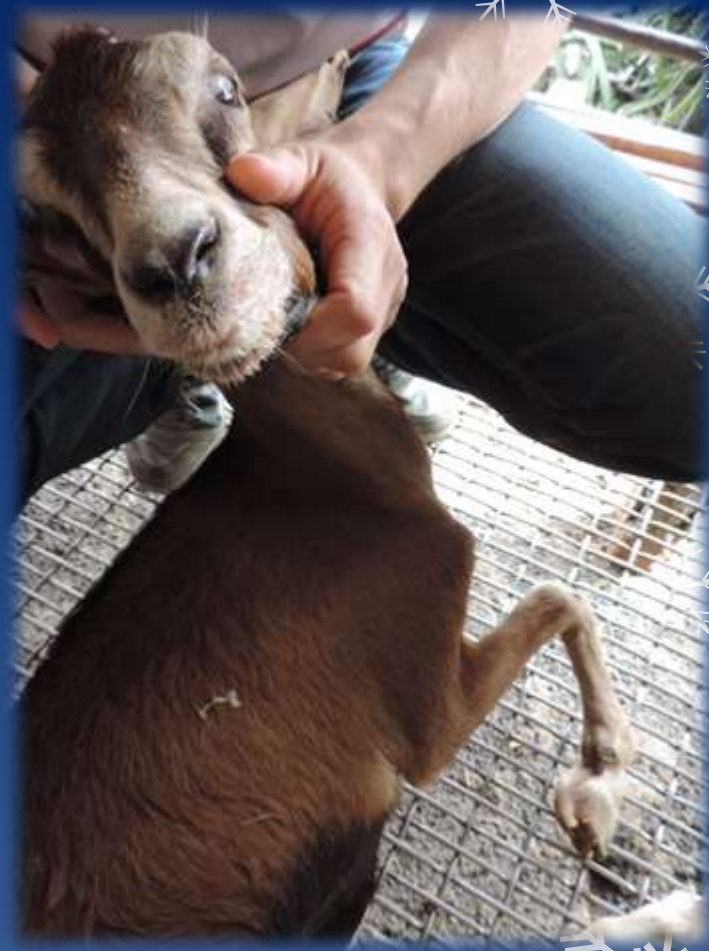
行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

20

臨床症狀



臨床症狀



✧ 虛弱無法站立、歪頭



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

肉眼病變





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

23

肉眼病變



AHRI

行政院農業委員會

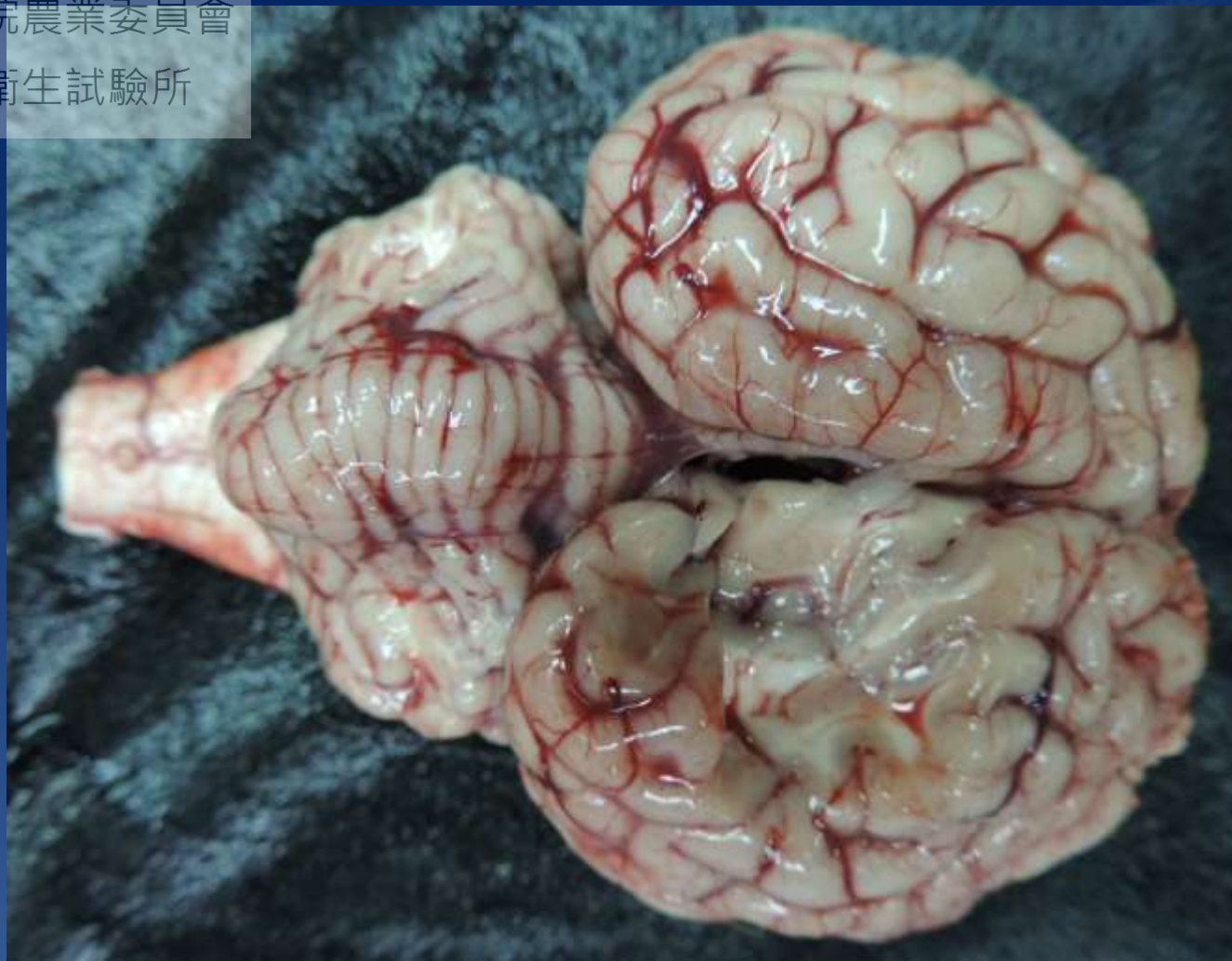
肉眼病變





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

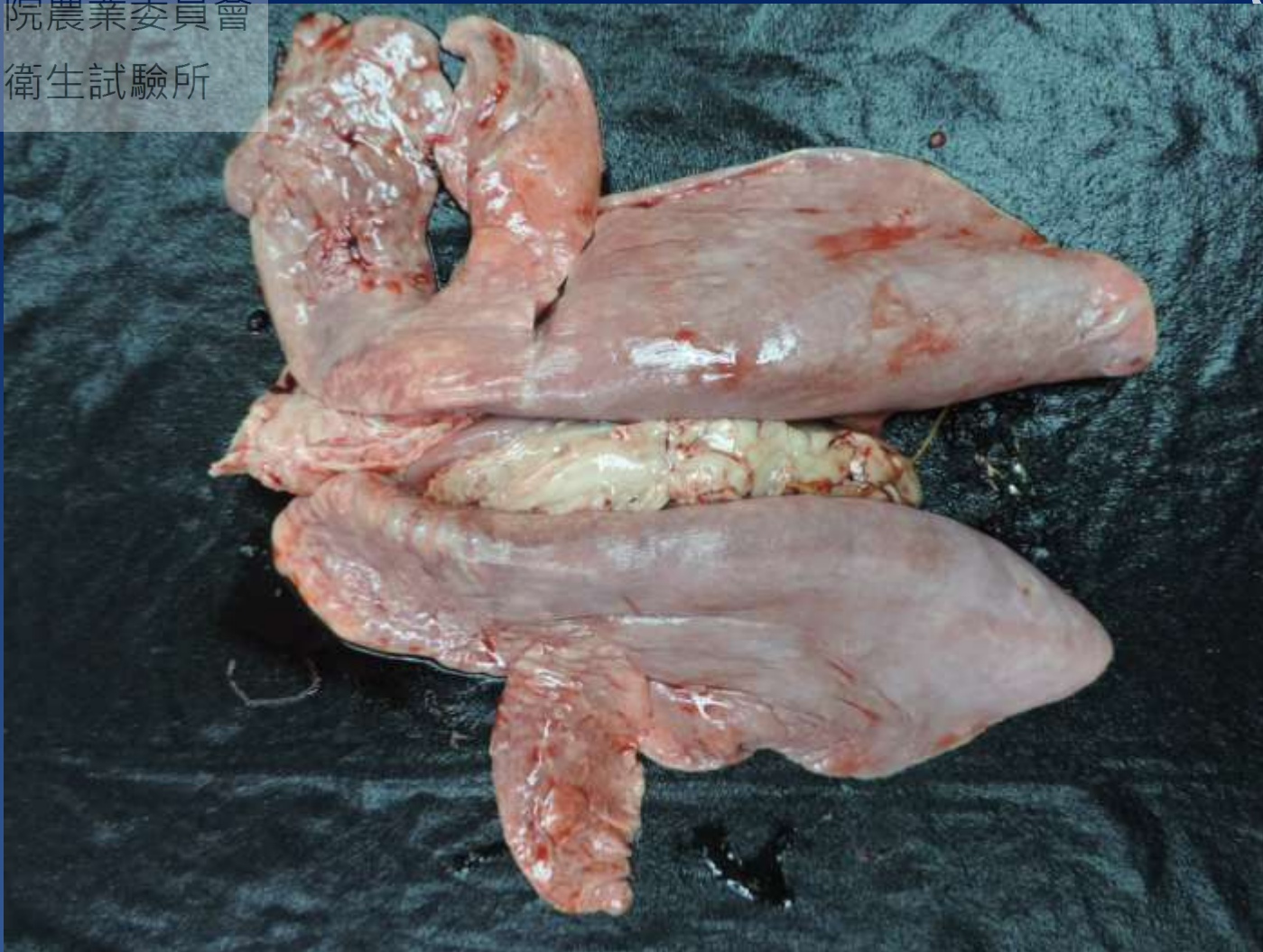


●病羊大、小腦的腦溝呈現充血之情形



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



●肺臟左側尖、心葉腹側處呈現蒼白
斑駁樣，其觸感堅實



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

27



暫時性診斷

山羊李斯特菌症



實驗室檢查

微生物學檢查

✧ 自肝臟、肺臟、大腦及脊髓液中進行採樣，培養於 blood agar、chocolate agar 及 XLD agar

✧ 分別置於

1. 37°C 二氧化碳 (5%)

2. 4°C

3. 4°C 厭氧

4. 25°C 厭氧

培養48 ~ 72小時

✧ 無菌落生長。

微生物學檢查

- ✧ 採集腦及肺組織與 PBS 混合成10倍乳劑
- ✧ 使用 QIAamp DNA Mini Kit 進行核酸萃取
- ✧ 以 PCR 檢測 *L. monocytogenes* 與 *Mycoplasma spp.*
[Aznar & Alarcón, 2003; Anne, 2010]
- ✧ PCR 結果皆為陰性

病毒學檢查

- ✧ 將腦、肺、肝及淋巴結等臟器與 PBS 混合成10倍乳劑
- ✧ 使用 QIAamp DNA Mini Kit 進行核酸萃取
- ✧ 以 PCR 檢測 山羊關節炎腦炎(CAE) 之病毒核 [Fieni *et al.*, 2002]
- ✧ PCR 結果皆為**陰性**



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

32

組織病變



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

33

腦 部

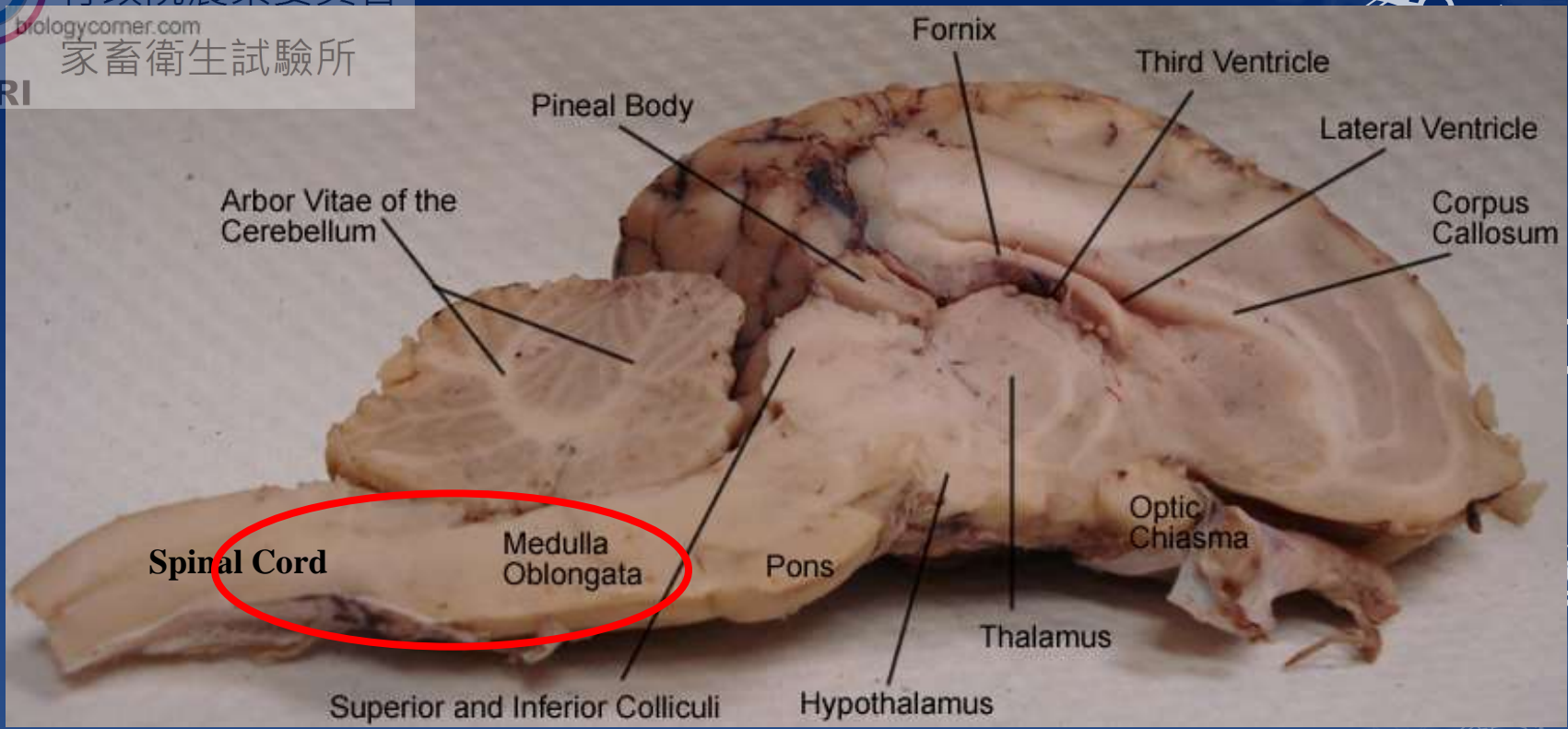


行政院農業委員會

biologycorner.com

家畜衛生試驗所

AHRI

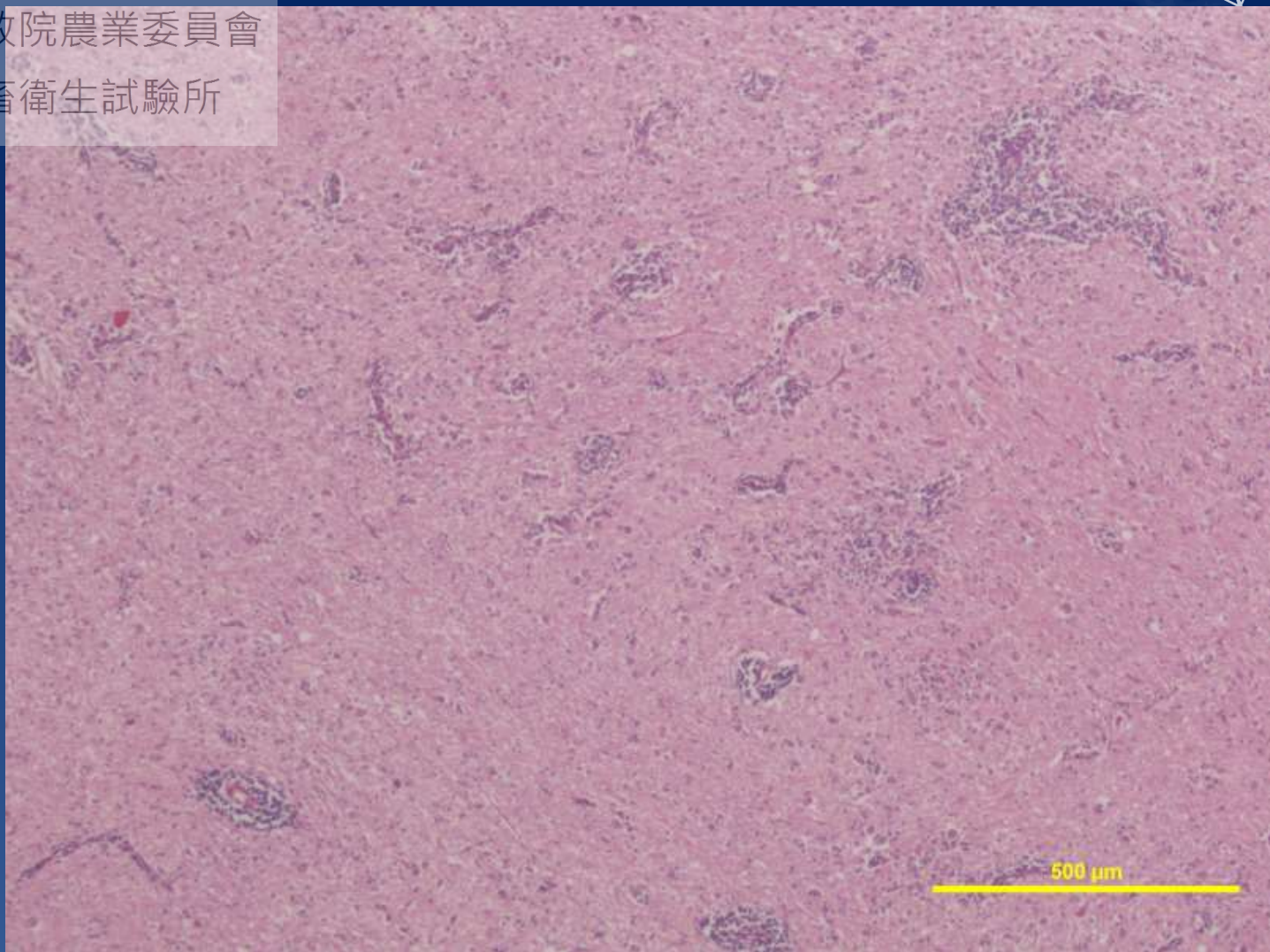


本病例之腦部病變主要位於延髓及脊髓近側端。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

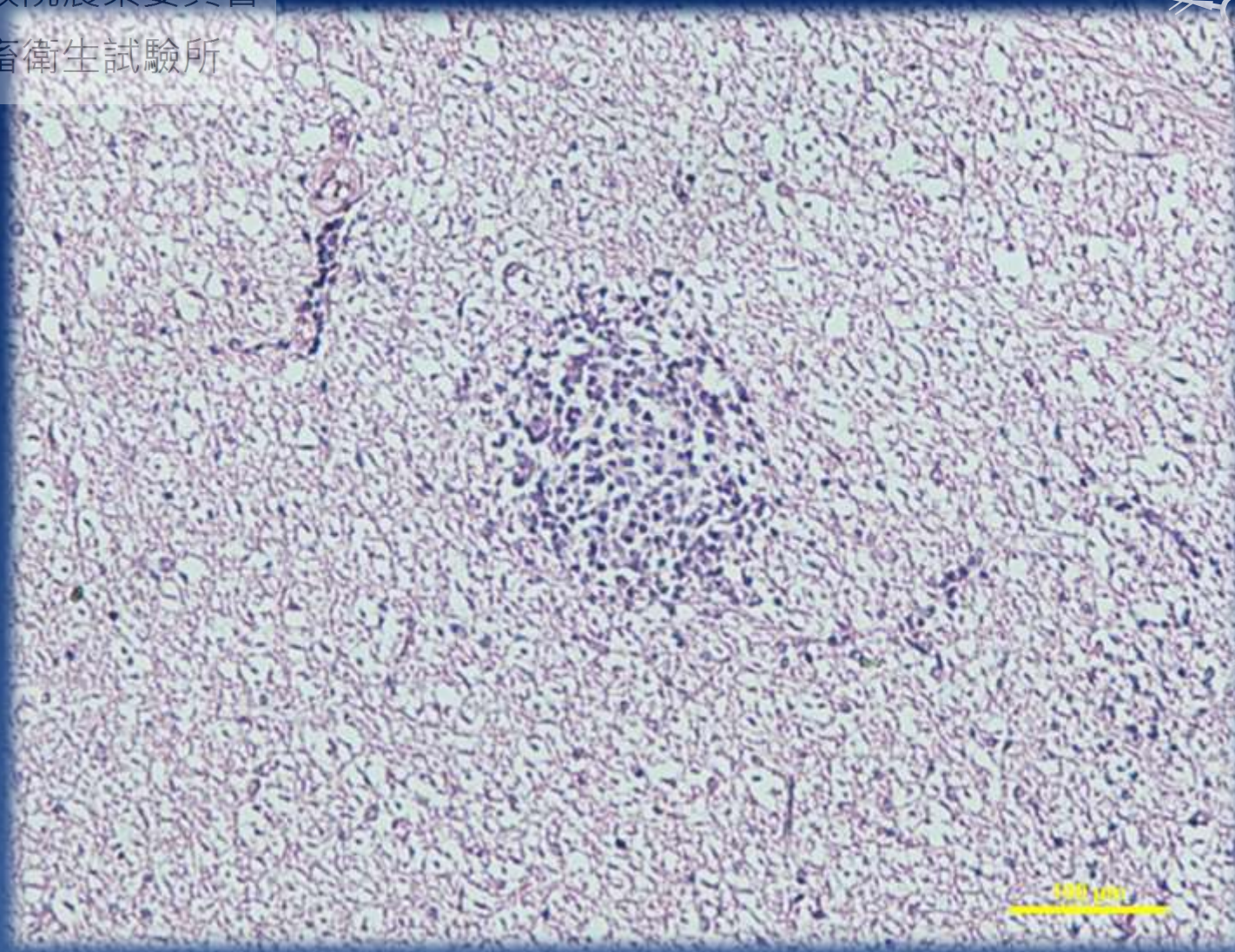


實質部呈現許多由單核炎症細胞構成的多發性局部小膿瘍。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

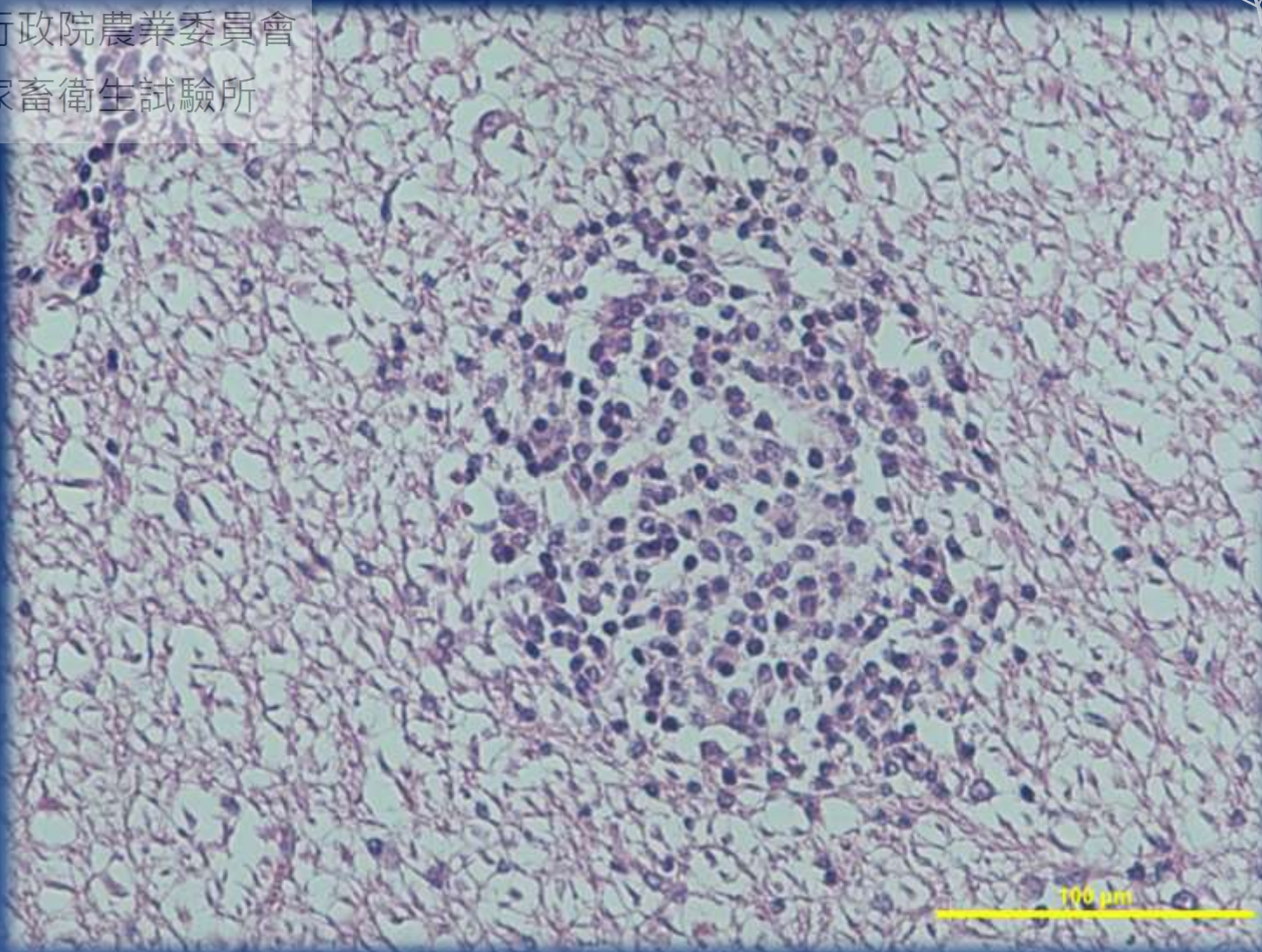


由單核炎症細胞構成的局部小膿瘍



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

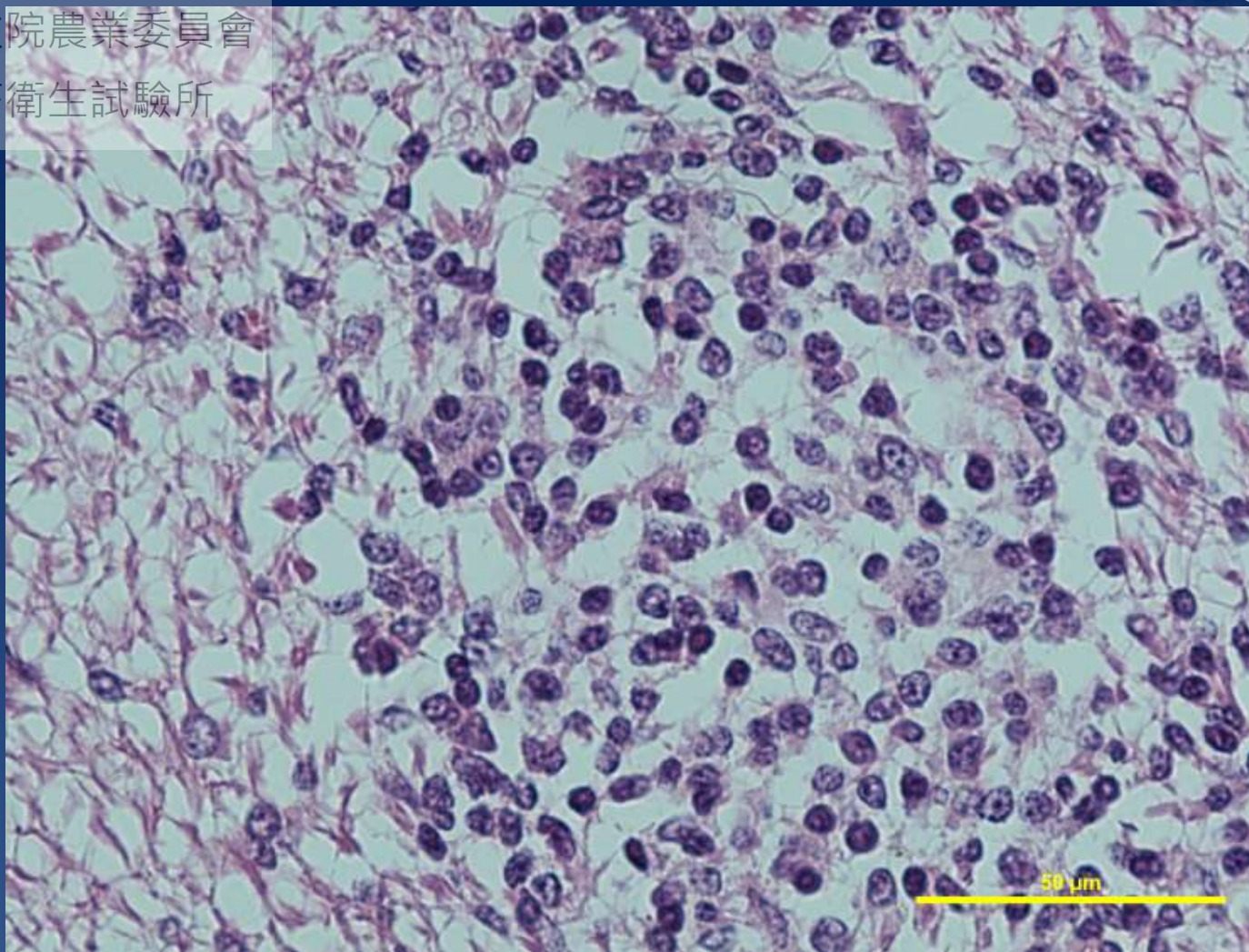


由單核炎症細胞構成的局部小膿瘍、
實質部呈現脫髓鞘之情形。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

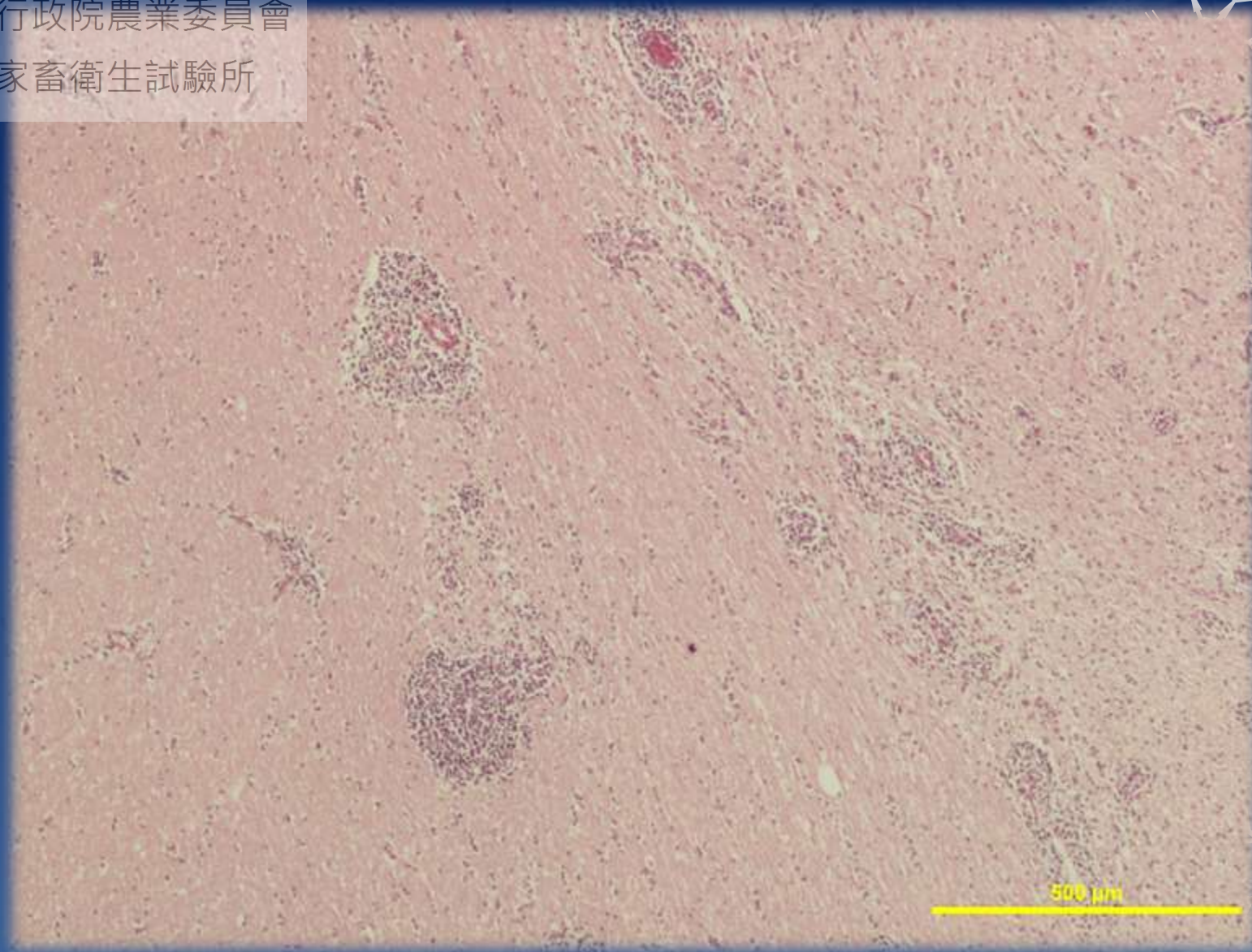


由單核炎症細胞構成的局部小膿瘍、
實質部呈現脫髓鞘之情形。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

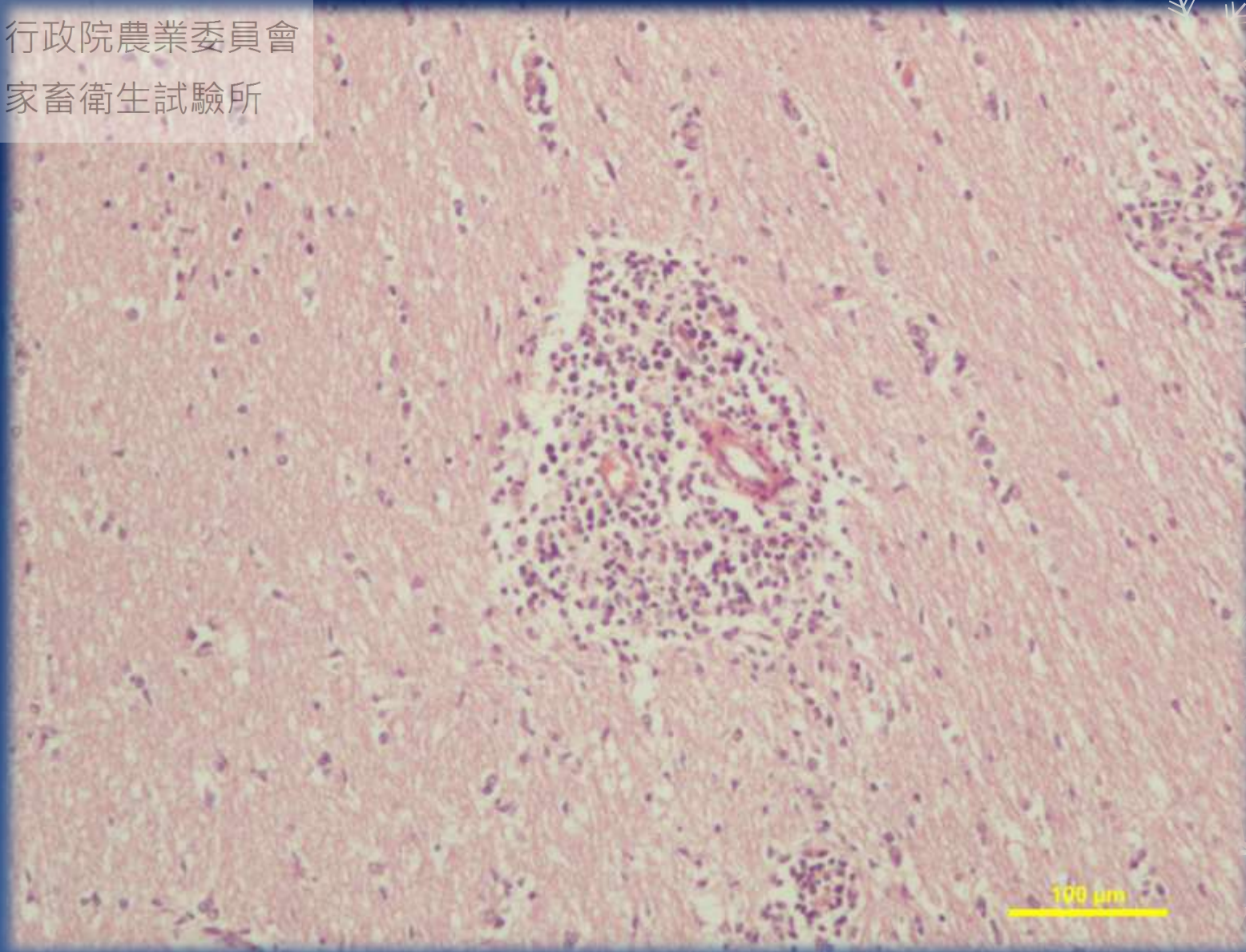


血管周圍有單核炎症細胞的圍管現象



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

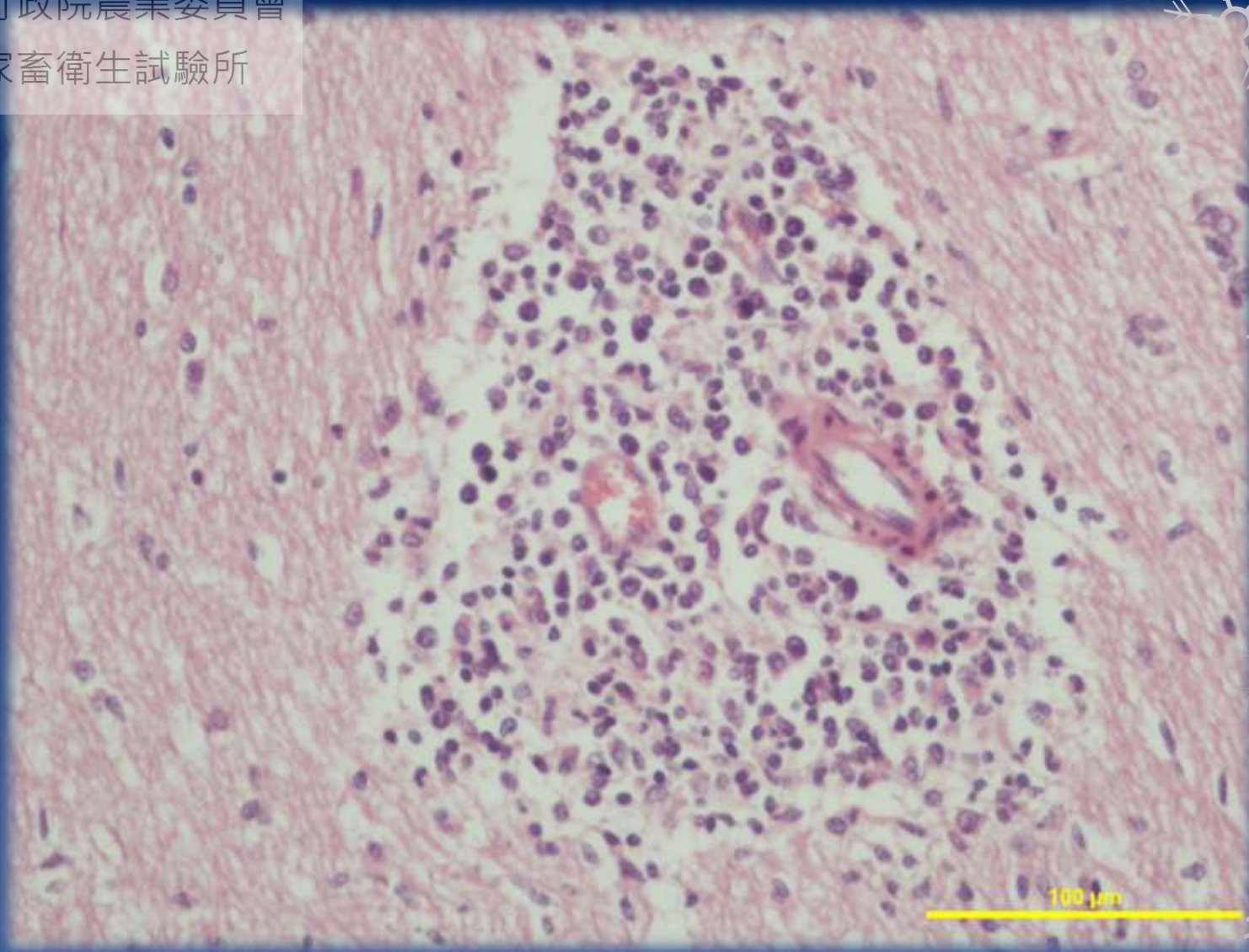


血管周圍有單核炎症細胞的圍管現象



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

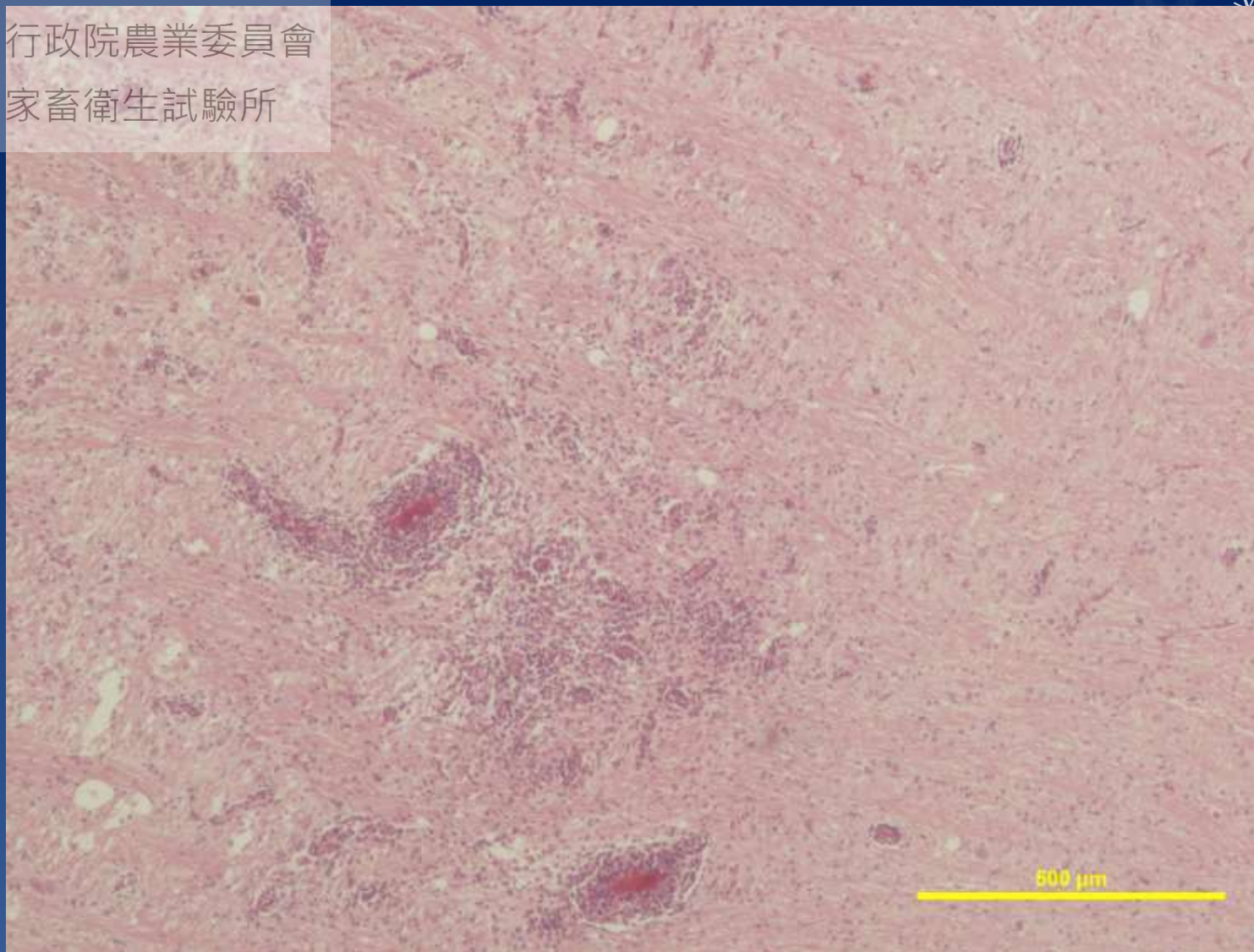


血管周圍有單核炎症細胞的圍管現象



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

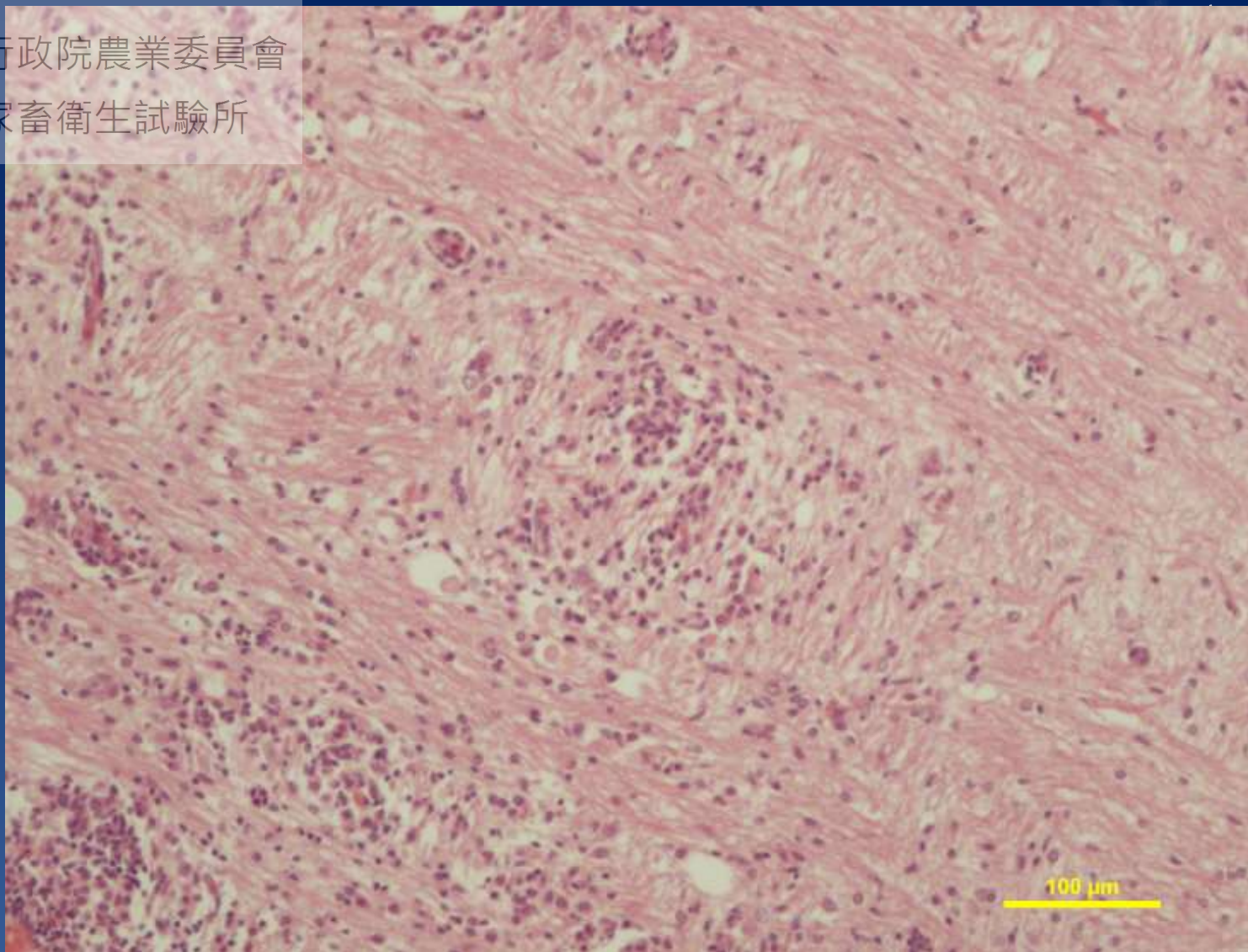


血管圍管現象、多發性局部小膿瘍



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

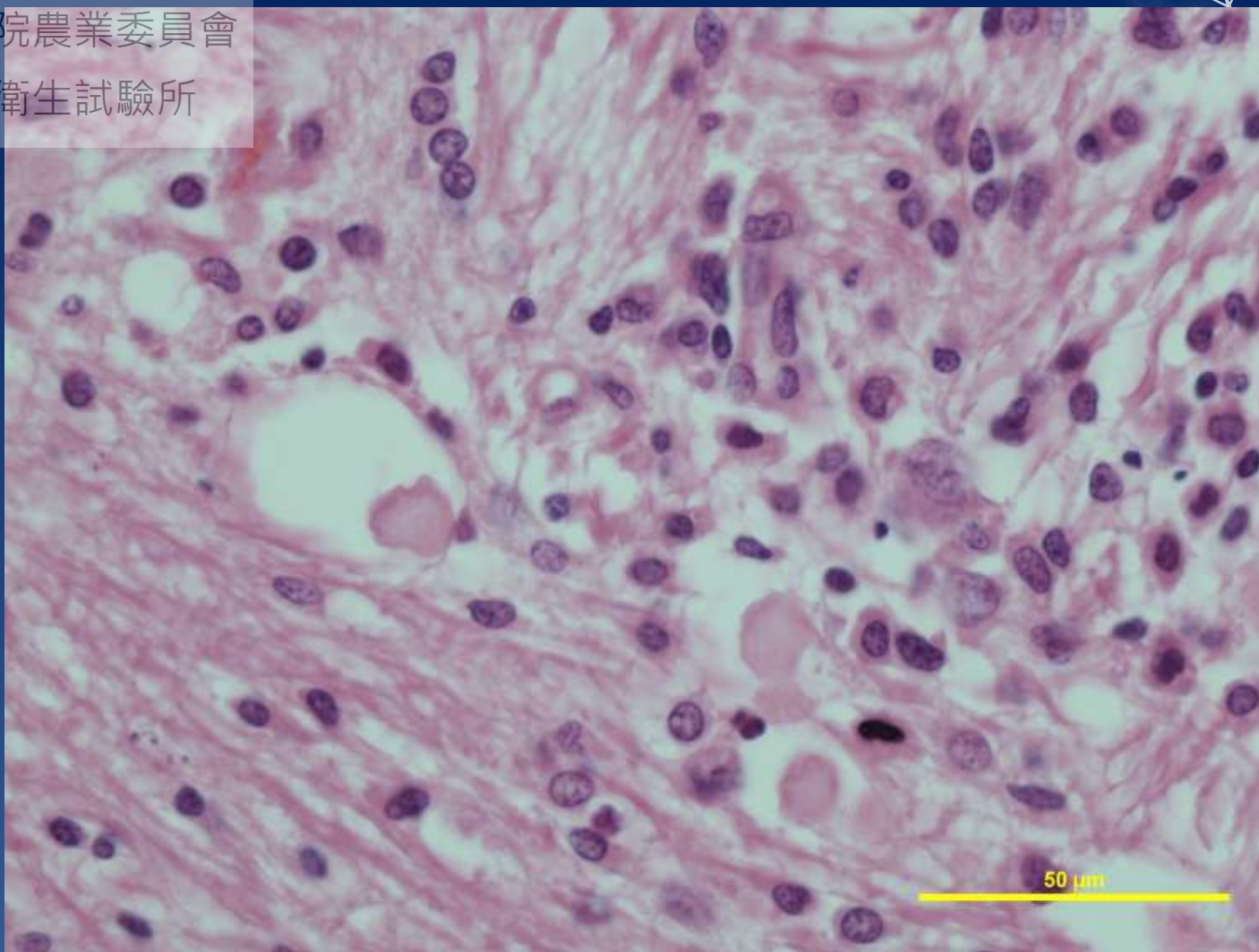


血管圍管現象、多發性局部小膿瘍及
神經細胞退行性變化



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

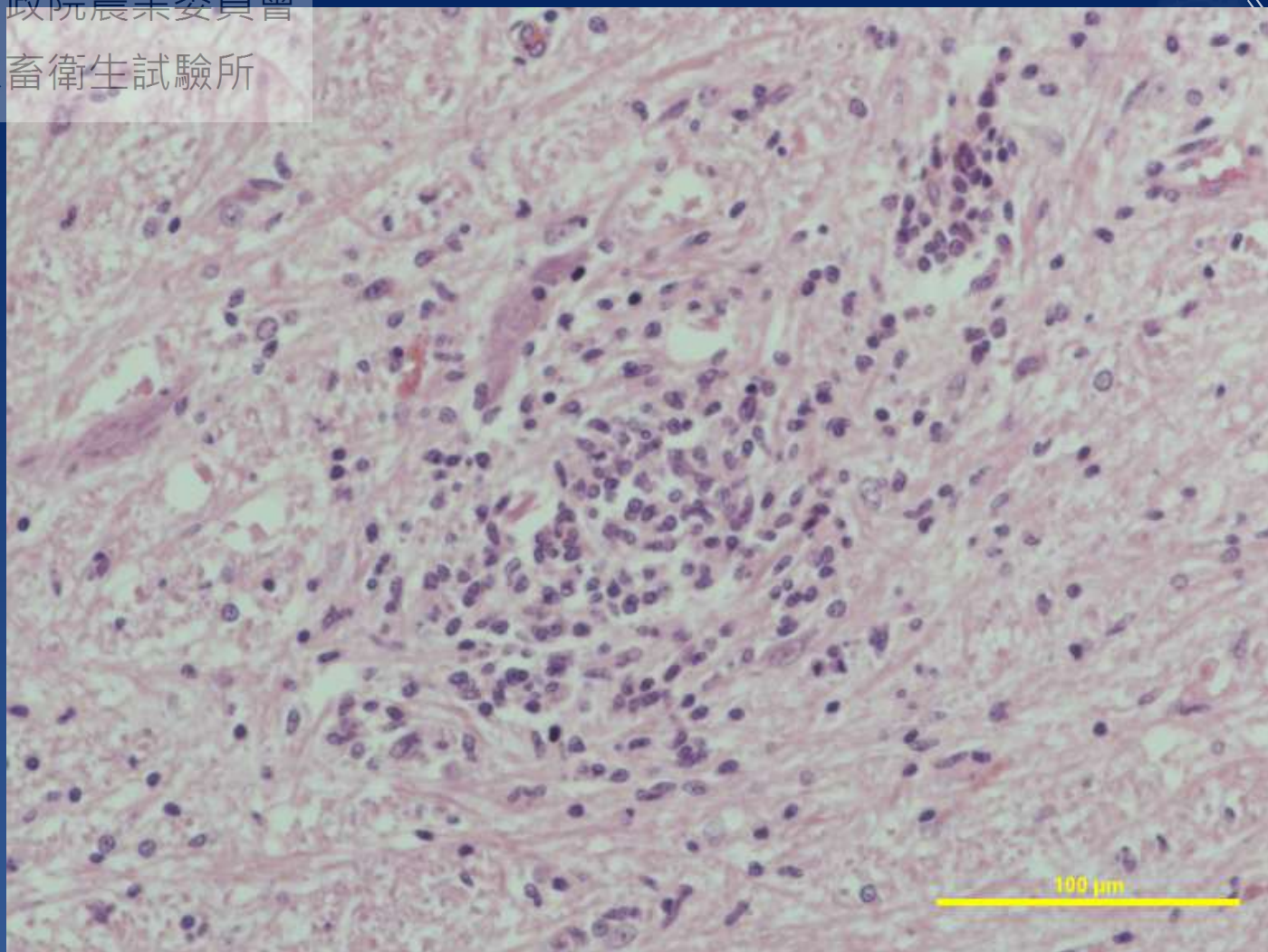


神經細胞退行性變化。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

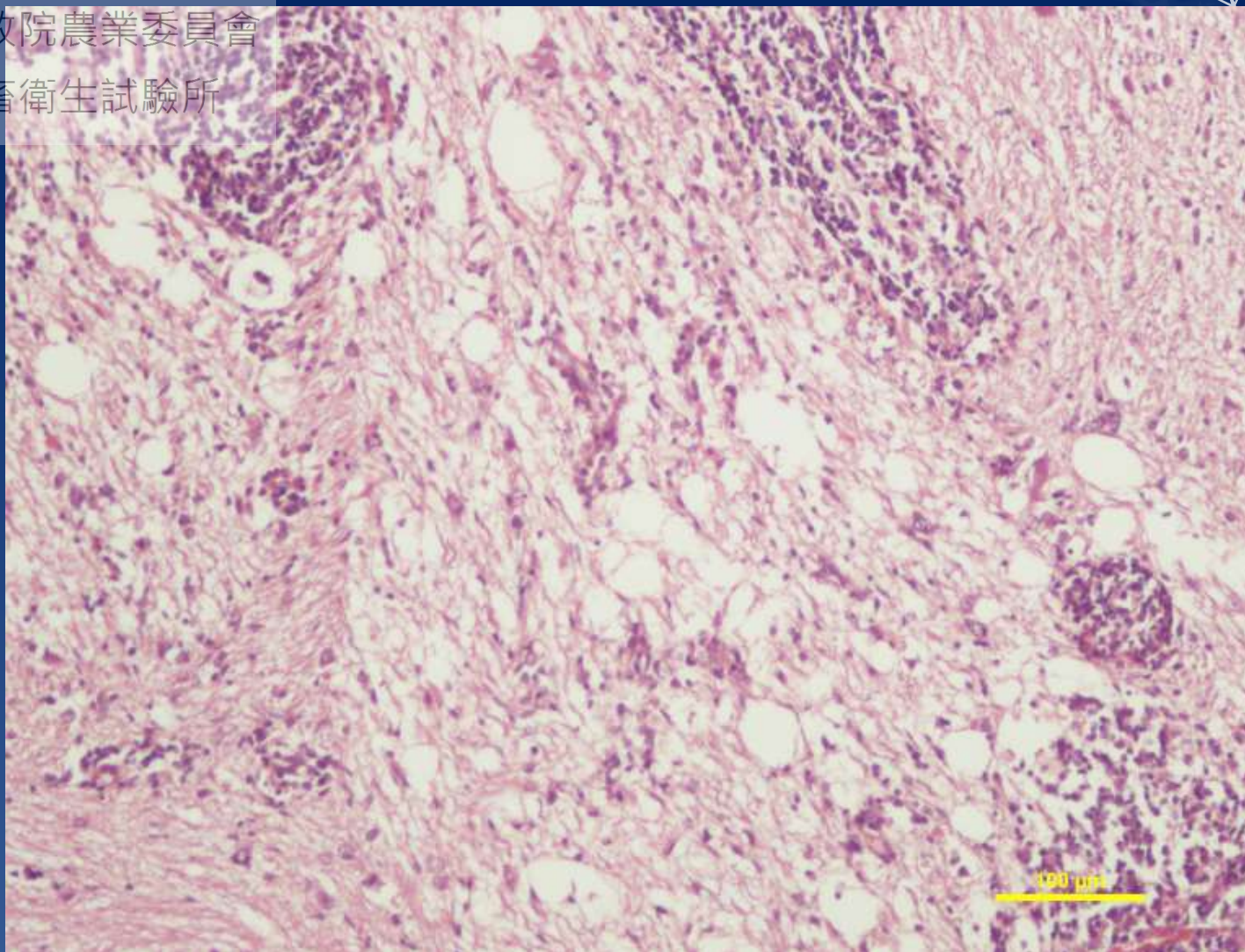


膠質細胞增生、神經元呈現退行性
變化



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

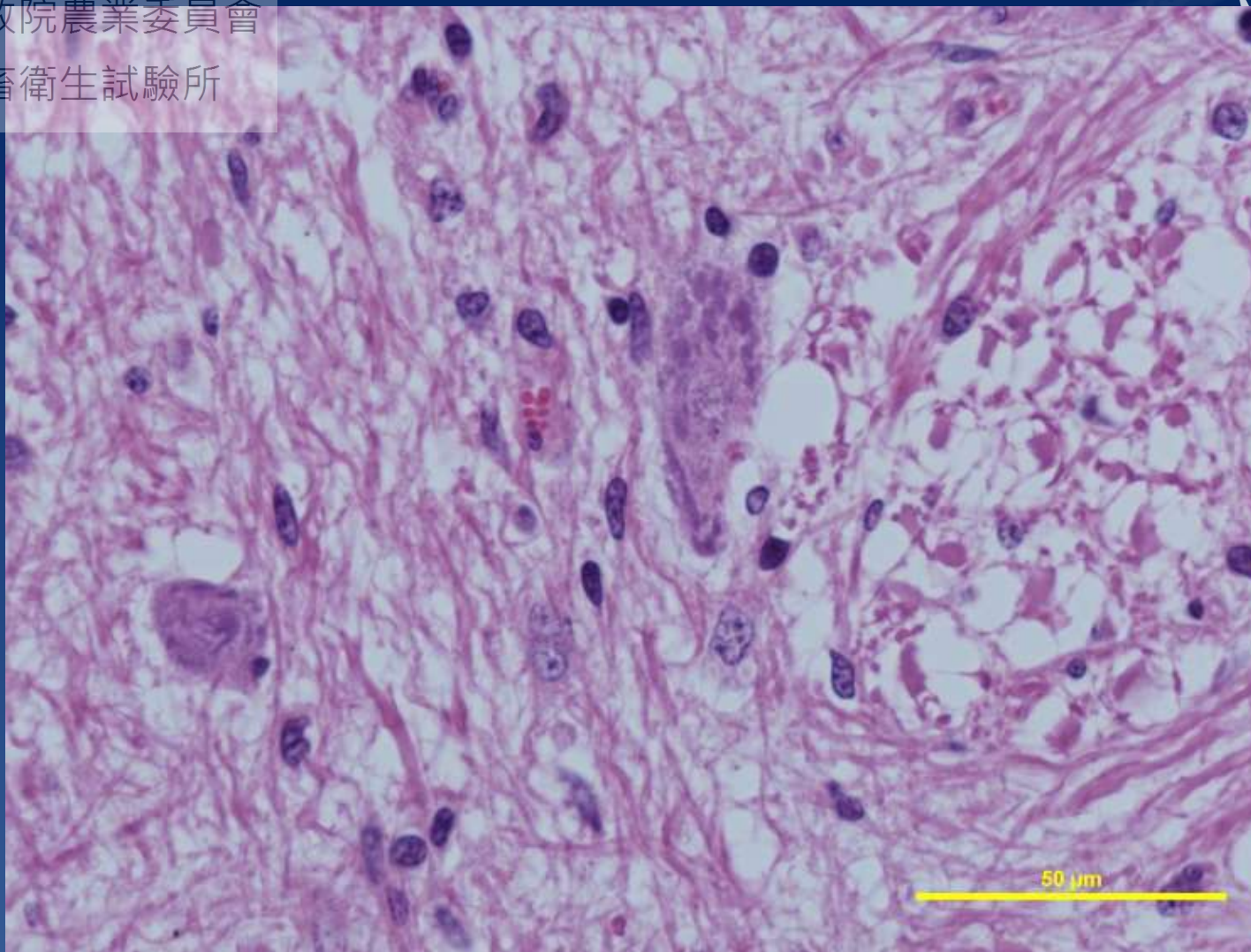


血管圍管現象、實質部呈現區域性的空泡化與脫髓鞘的情形



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

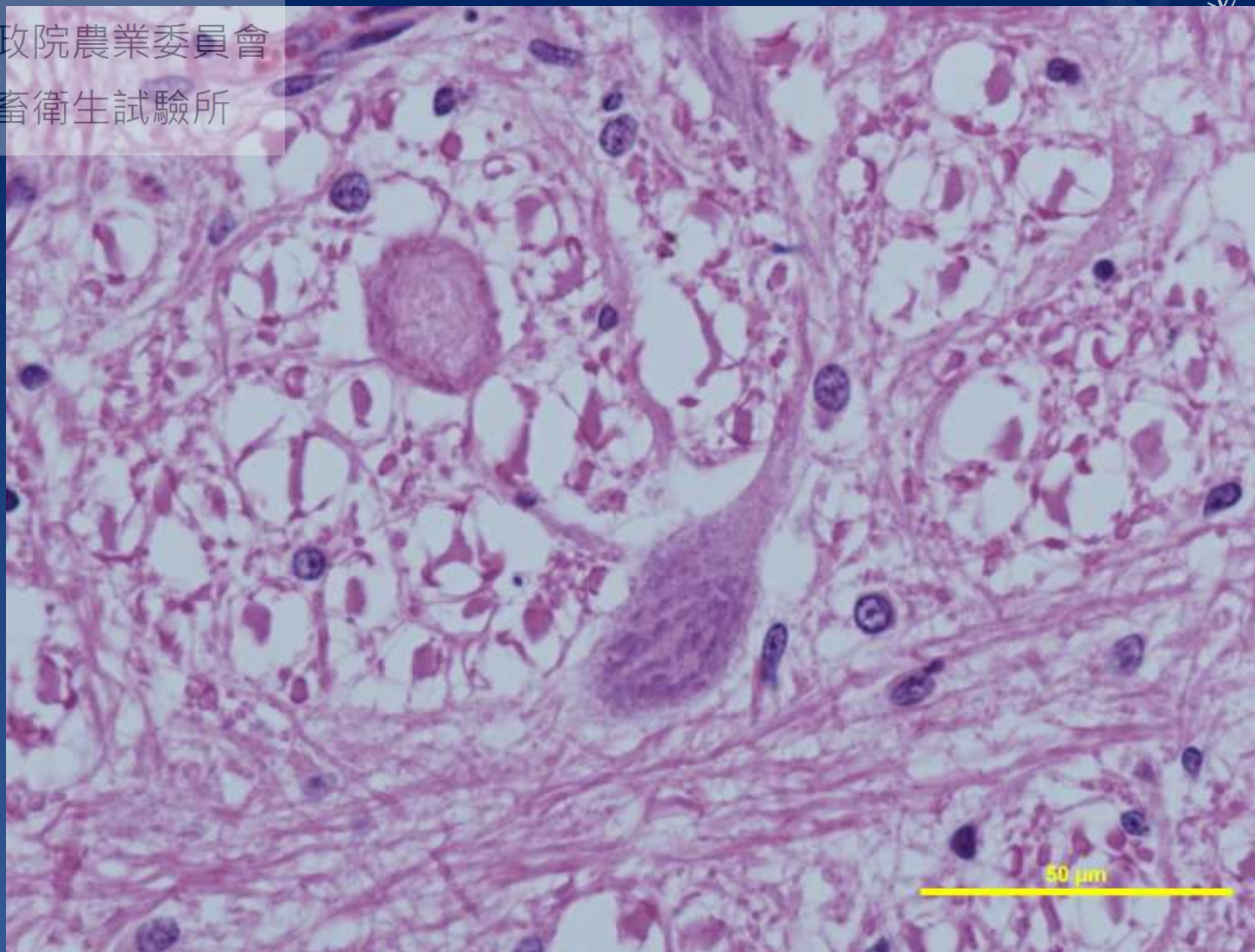


神經細胞退行性變化、實質部呈現
區域性的空泡化與脫髓鞘的情形



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



神經細胞退行性變化、實質部呈現
區域性的空泡化與脫髓鞘的情形



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

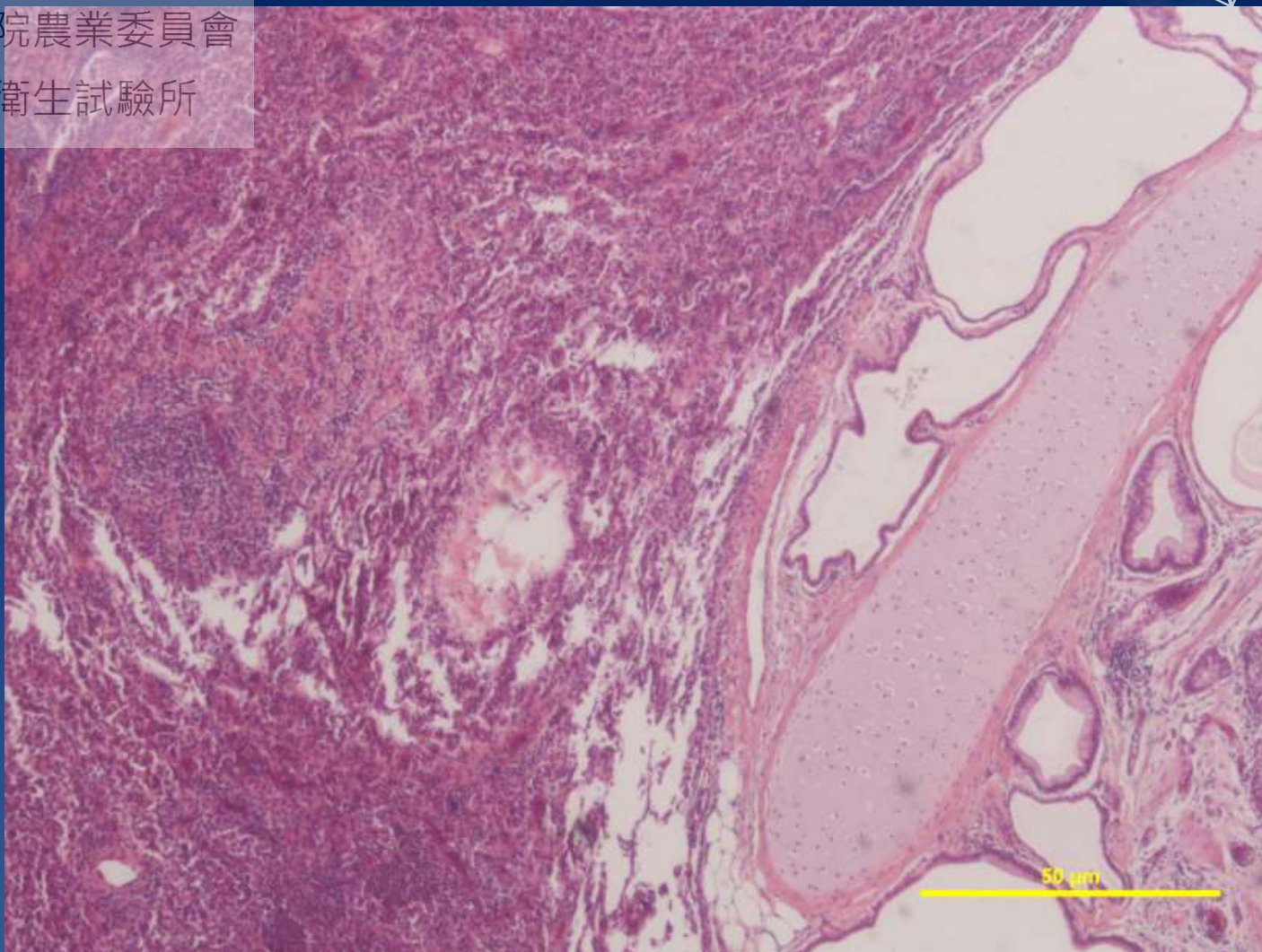
49

肺 臟



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

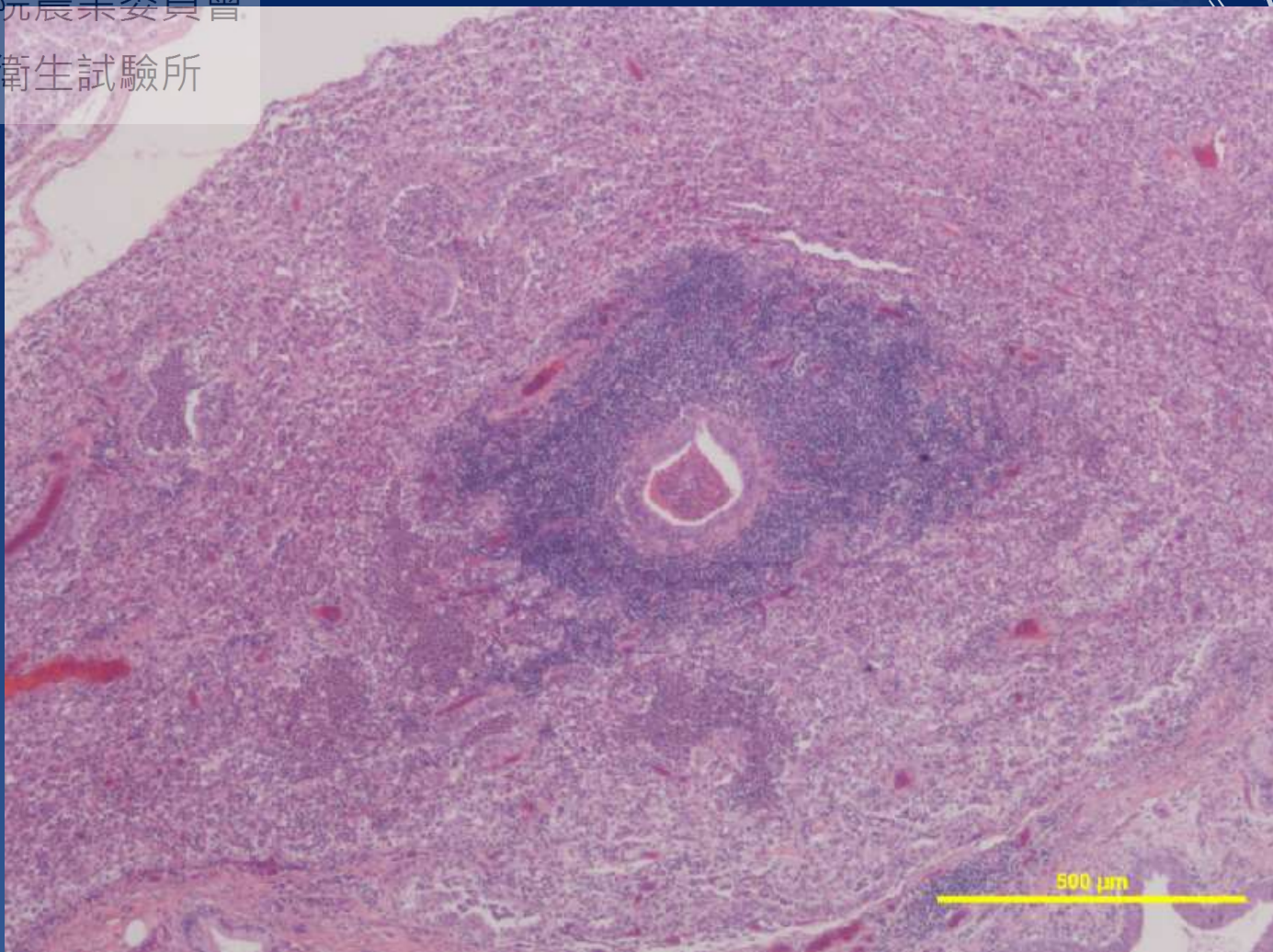


肺臟於尖、心葉腹側病變處失去正常的肺泡組織結構，其組織間充血，並由大量嗜中性球為主的炎症細胞浸潤實質部



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

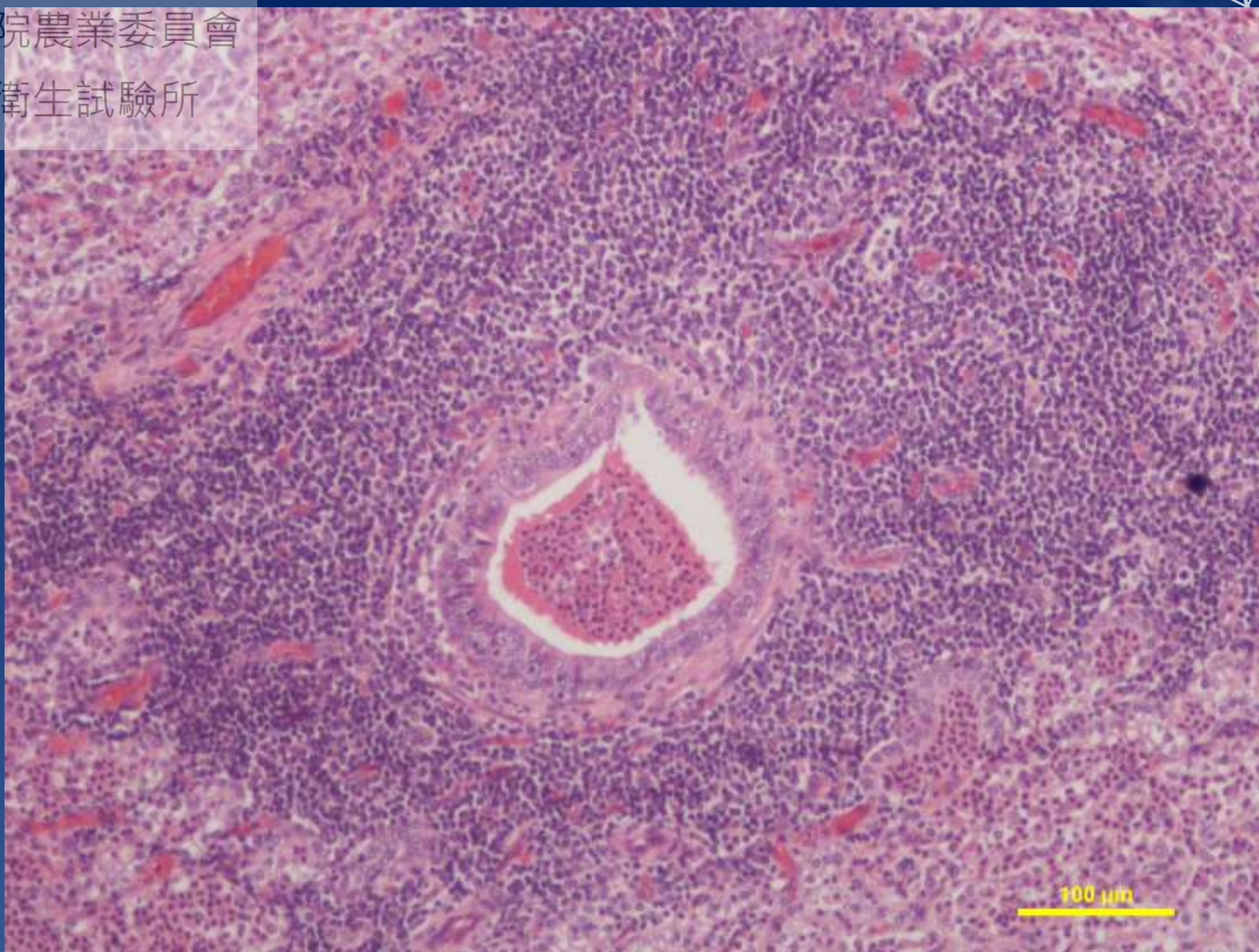


於細支氣管或小血管外圍可見以大量
淋巴球為主的炎症細胞聚集浸潤



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

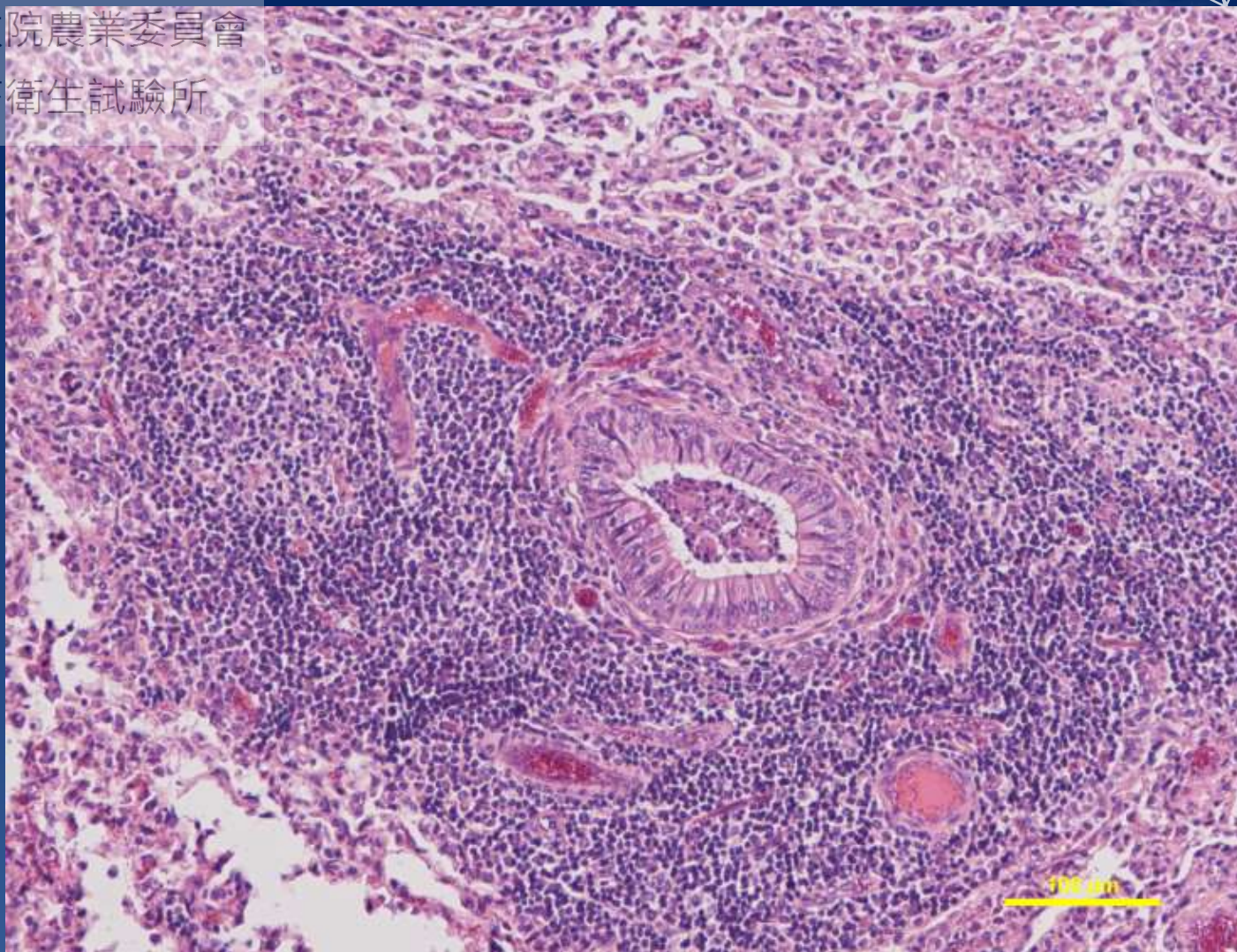


於細支氣管或小血管外圍可見以大量
淋巴球為主的炎症細胞聚集浸潤



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



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



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

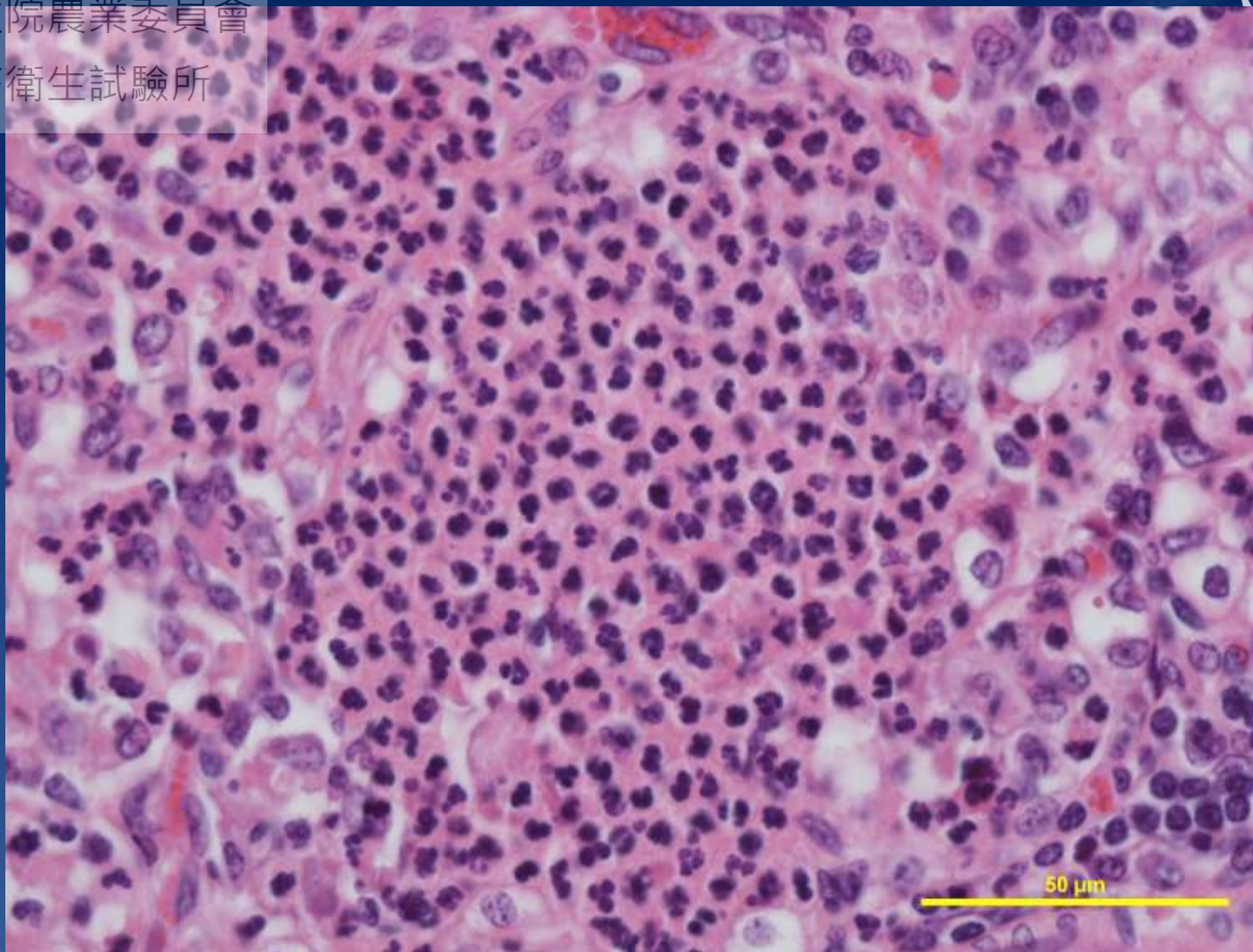


細支氣管管腔中含有許多由嗜中性球
及壞死細胞碎片所構成的膿性滲出物



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



肺臟間質被嗜中性球為主的炎症細胞
浸潤



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

免疫組織化學染色法



本試驗委請行政院農業委員會家畜衛生試驗所協助執行

- 組織切片經xylene脫臘，用系列梯度酒精進行水合反應，後水洗。
- 浸泡蛋白脢K 15分鐘進行抗原修復，用tris緩衝液沖洗。
- 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) 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，用tris緩衝液沖洗。
- 滴上MACH 3 Polymer覆蓋切片20分鐘，用tris緩衝液沖洗。
- 使用Warp Red™染色3分鐘，後用蒸餾水沖洗。
- 以Mayer's haematoxylin進行對比染色，後用蒸餾水沖洗。
- 置入烘箱烘乾，以阿拉伯膠封片，置放隔夜待其風乾。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

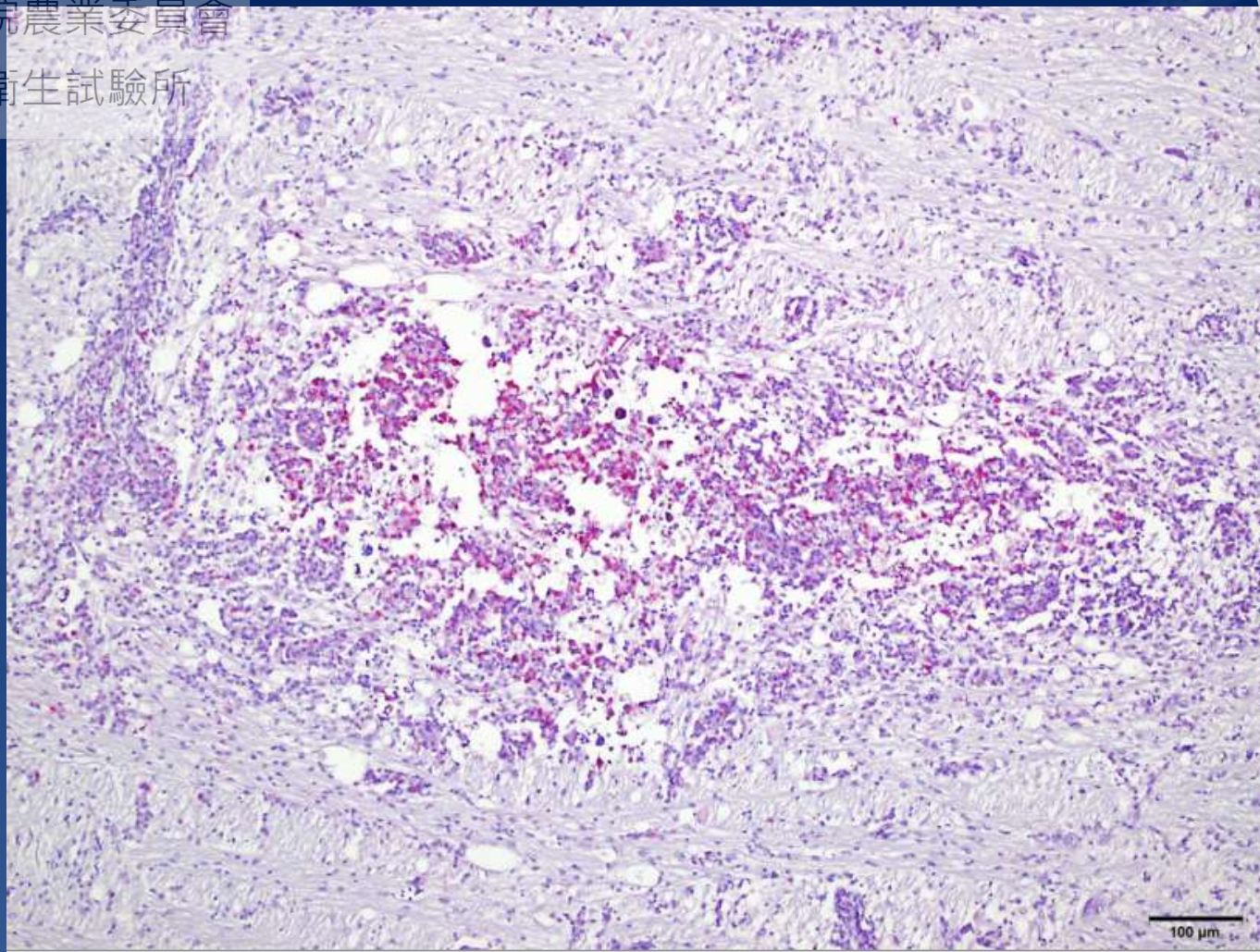
免疫組織化學染色結果





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

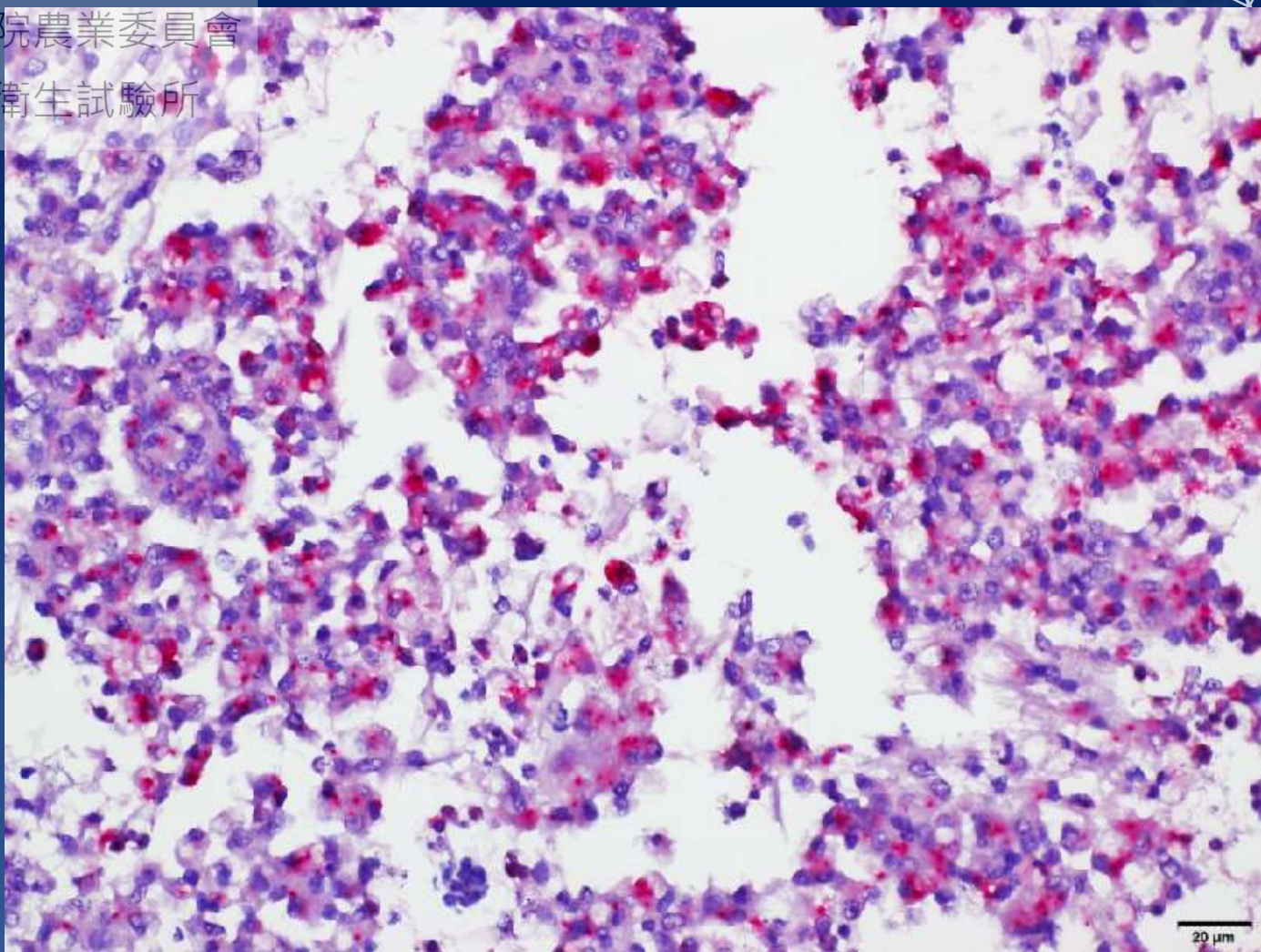


延髓及脊髓處的小膿瘍，其單核炎症細胞
的細胞質內呈現李斯特菌抗原陽性反應的
紅色訊號



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

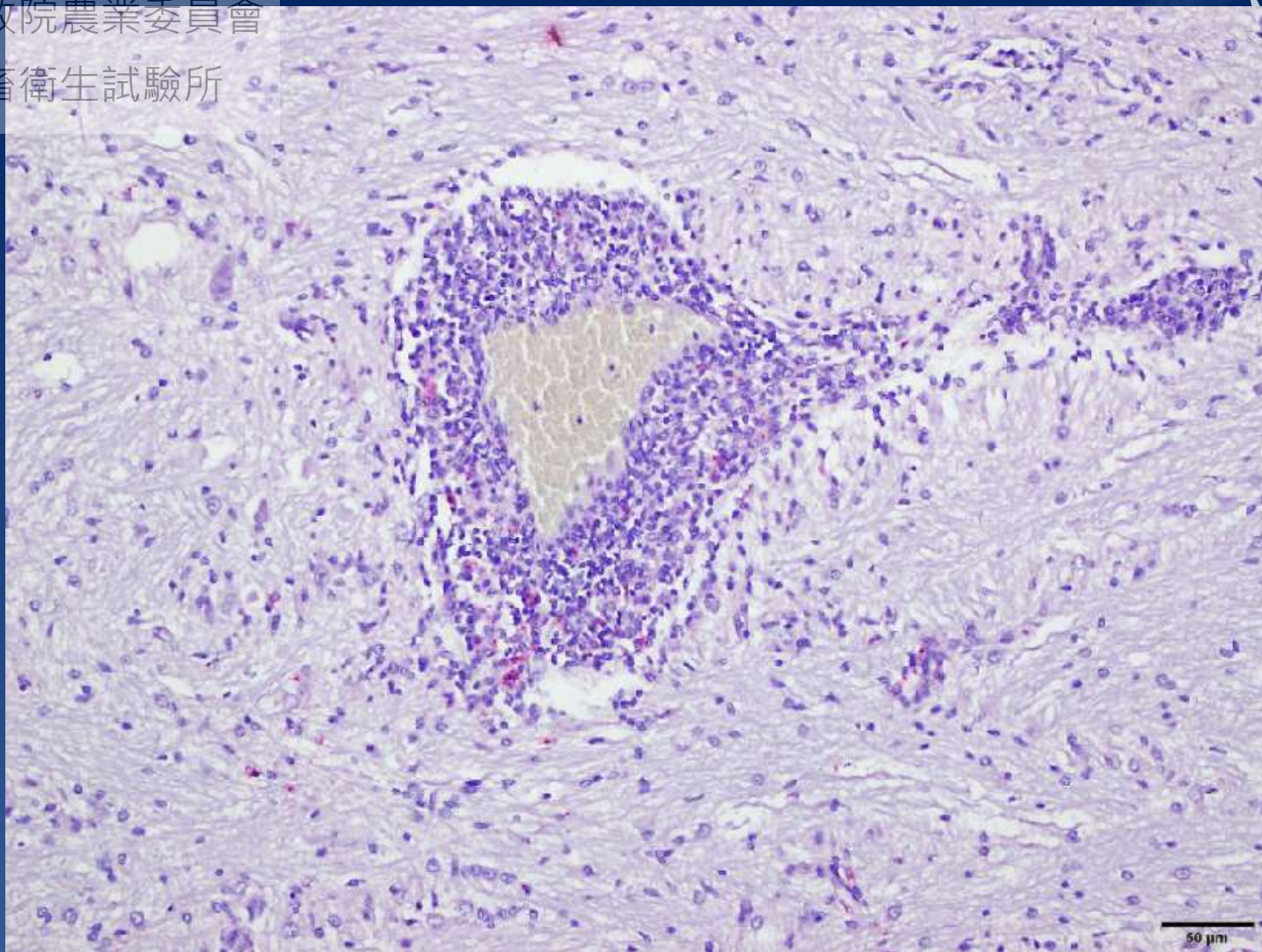


延髓及脊髓處的小膿瘍，其單核炎症細胞
的細胞質內呈現李斯特菌抗原陽性反應的
紅色訊號



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

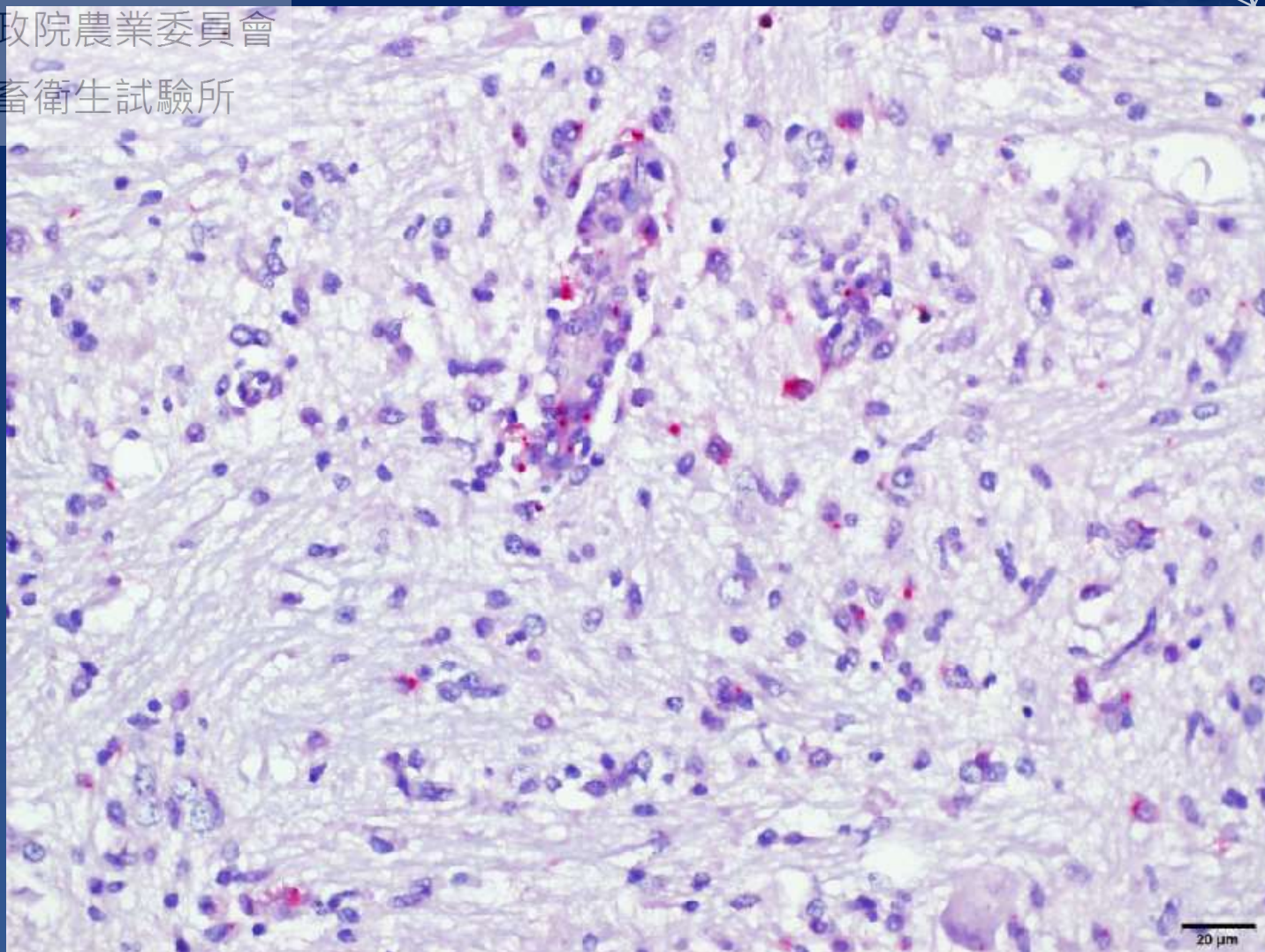


圍管現象的單核炎症細胞呈現出少量的
李斯特菌抗原陽性反應的紅色訊號



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



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



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



病因	臨床症狀	肉眼病變	組織病理
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 出血及潰瘍	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



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

最終診斷

山羊李斯特菌症



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

65

處置及預防控制



AHRI

行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

處置及預防控制

- ✧ 發病羊隻隔離，並以amoxicilline 合併 gentamicin 治療或淘汰
- ✧ 畜舍、飲水器、飼槽及周圍環境實施消毒
- ✧ 青貯槽淨空時須徹底消毒(碘化合物、氨或四級胺)



處置及預防控制

- ✧ 須待青貯料熟成後 (至少 1 個月) 再開封使用
- ✧ 添加可溶性碳水化合物提供乳酸菌利用生成乳酸
- ✧ 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





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

68

後續疫情追蹤調查



行政院農業委員會

家畜衛生試驗所

AHRI

後續疫情追蹤調查



- ✧ 4月初電訪畜主，疫情已趨緩
- ✧ 對半徑5公里的6場畜牧場進行訪視，皆無疫情發生
- ✧ 使用相同毛豆殼來源的牧場皆無疫情發生





AHRI

行政院農業委員會

畜產衛生試驗所

青貯料 pH 值測定



pH 4.70

pH 4.53

pH 4.53



討論



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



病因 — *Listeria monocytogenes*

- ✧ 革蘭氏陽性桿菌
- ✧ 厚壁菌門 (Firmicutes)
芽孢桿菌目 (Bacillales)
李斯特菌屬 (*Listeria*)
- ✧ 長1~2 μm ，寬0.5 μm



[<http://www.msevens.com/cnsinfections/listeria-gs.jpg>]



病因 — *Listeria monocytogenes*

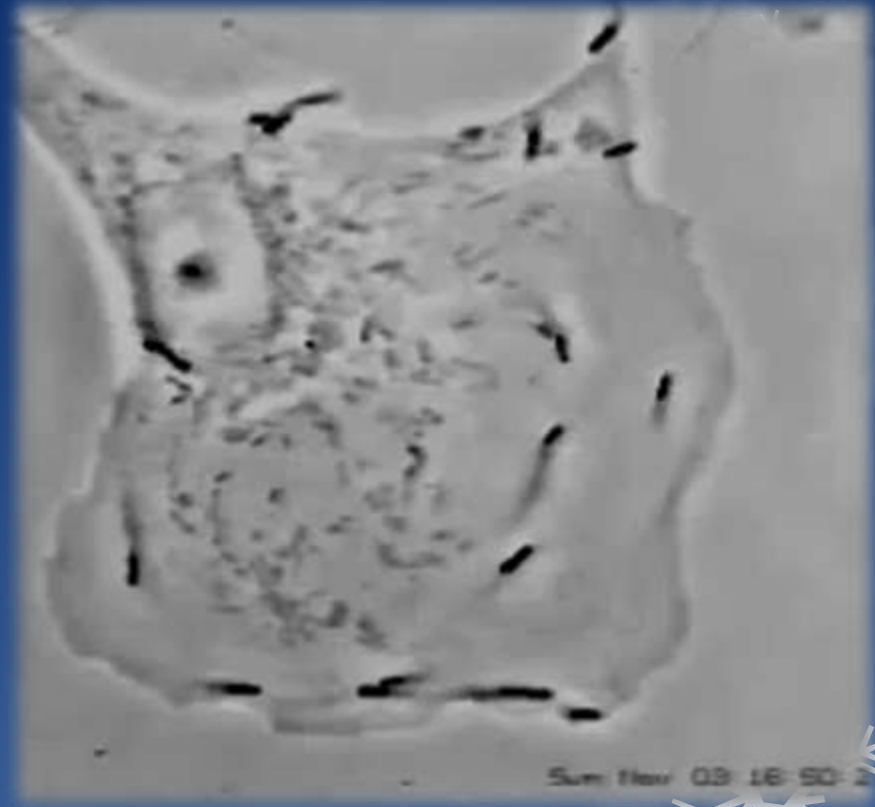
- ✧ 3~40°C 皆可生長
- ✧ 血液培養基產生不完全溶血環
- ✧ 1~4根周鞭毛
($\leq 30^{\circ}\text{C}$ 時具運動性)
- ✧ 兼性厭氧
- ✧ pH 9.6 ~ 5.6





病因 — *Listeria monocytogenes*

- ✧ 3~40°C 皆可生長
- ✧ 血液培養基產生不完全溶血環
- ✧ 1~4根周鞭毛
($\leq 30^{\circ}\text{C}$ 時具運動性)
- ✧ 兼性厭氧
- ✧ pH 9.6 ~ 5.6





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

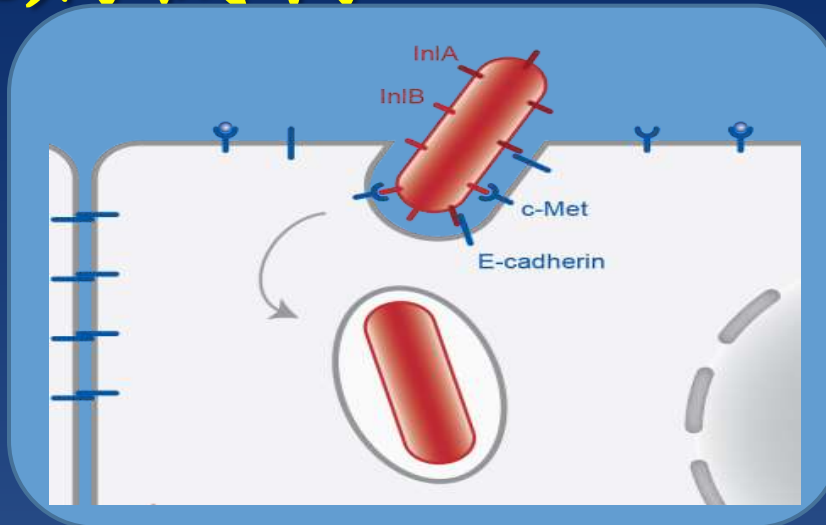
致病機制

✧ 目前證據顯示為食入感染





致病機制



- ✧ 表面蛋白 *Internalin A* 與宿主上皮細胞的鈣黏著素 E (E-cadherin) 結合，再經胞飲作用入細胞質中





AHRI

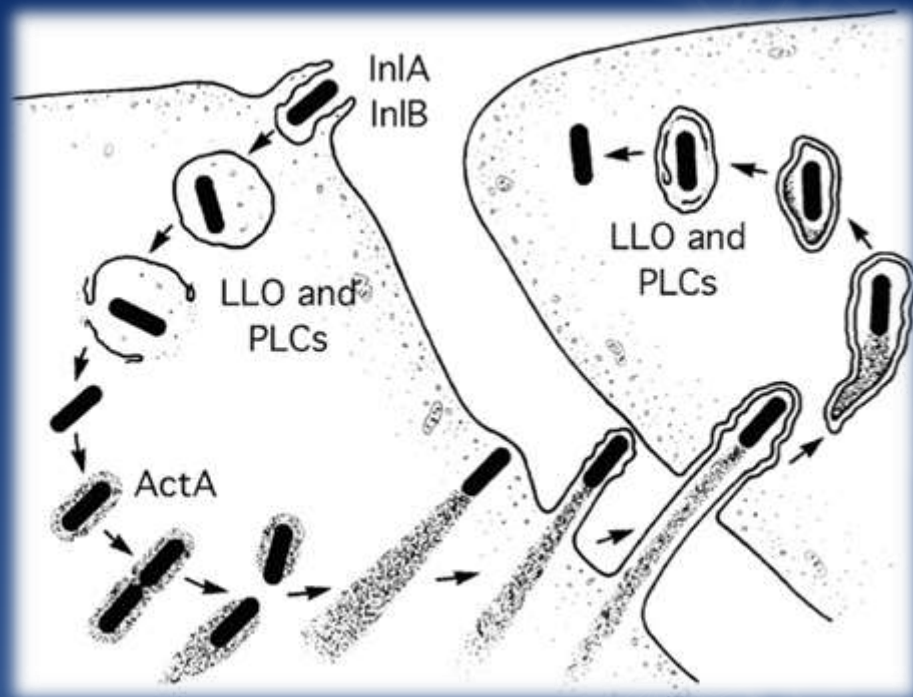
行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

77

致病機制



- * 分泌 *listeriolysin O* 與 **PI-PLC** 將液泡打破
 - * *listeriolysin O* 可抑制細胞免疫反應
 - * 細菌表面 *actA* 可誘導宿主細胞的肌動蛋白進行聚合作用
-
- 肌動蛋白將細菌推移到細胞膜，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



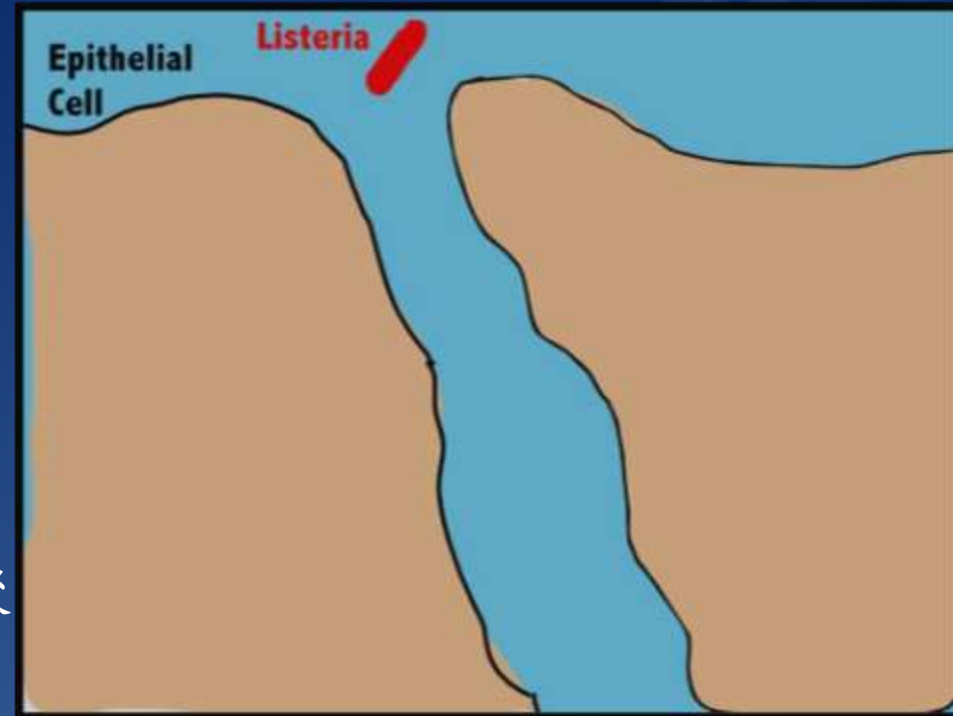


AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

致病機制

- * 分泌 *listeriolysin O* 與 **PI-PLC** 將液泡打破
 - * *listeriolysin O* 可抑制細胞免疫反應
 - * 細菌表面 *actA* 可誘導宿主細胞的肌動蛋白進行聚合作用
-
- 肌動蛋白將細菌推移到細胞膜，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





AHRI

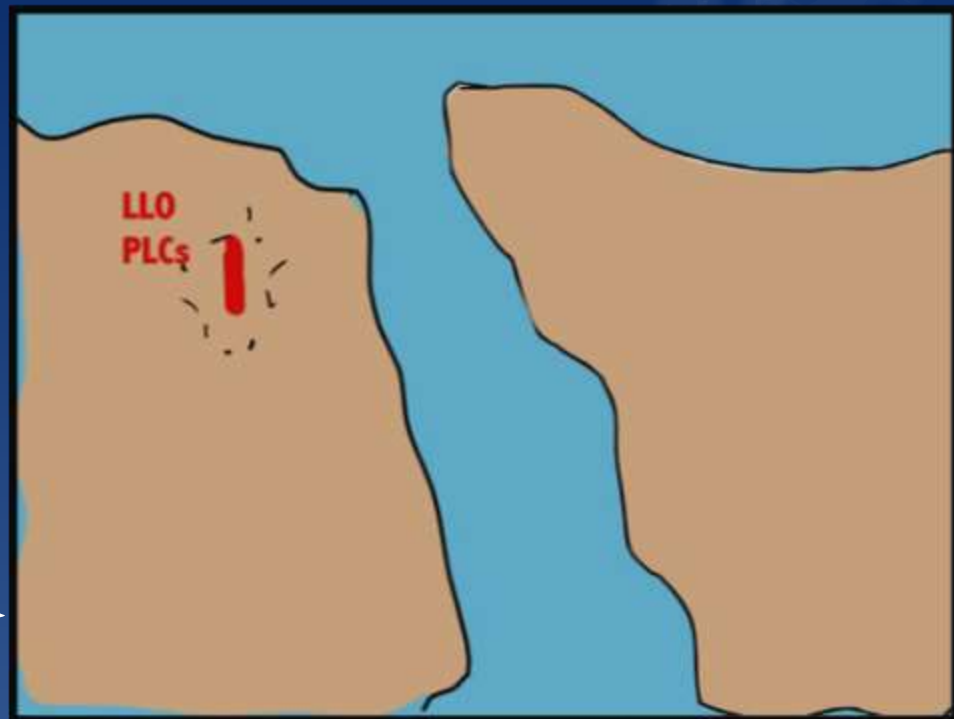
行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

79

致病機制



- * 分泌 *listeriolysin O* 與 PI-PLC 將液泡打破
- * *listeriolysin O* 可抑制細胞免疫反應
- * 細菌表面 *actA* 可誘導宿主細胞的肌動蛋白進行聚合作用
- 肌動蛋白將細菌推移到細胞膜，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





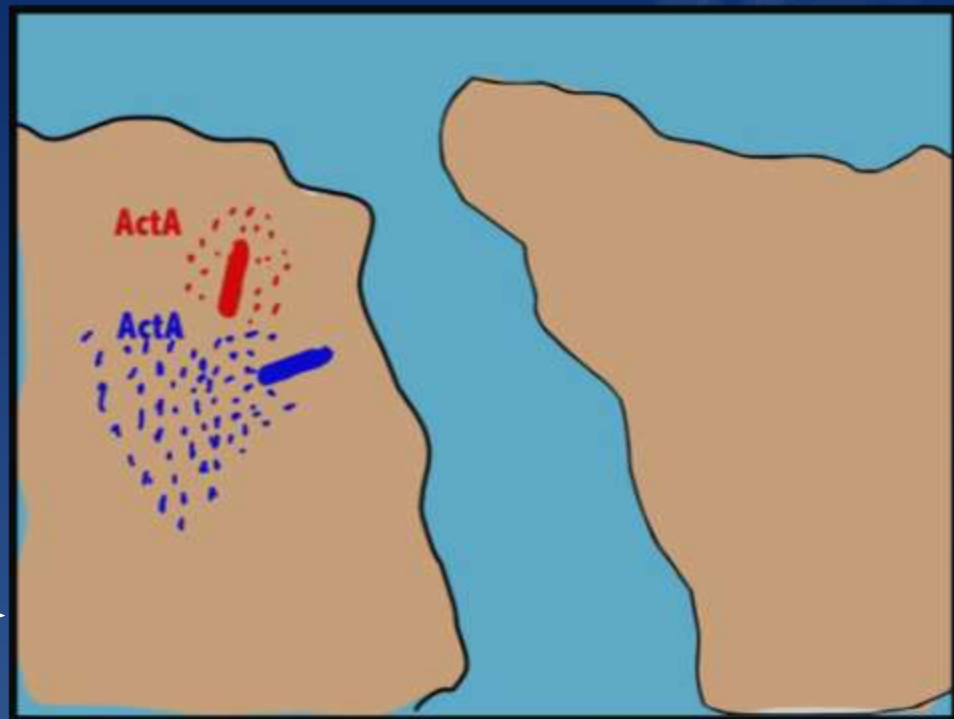
AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

80

致病機制

- * 分泌 *listeriolysin O* 與 **PI-PLC** 將液泡打破
 - * *listeriolysin O* 可抑制細胞免疫反應
 - * 細菌表面 *actA* 可誘導宿主細胞的肌動蛋白進行聚合作用
-
- 肌動蛋白將細菌推移到細胞膜，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





致病機制

- ✧ 傷口→黏膜下的結締組織，→鄰近的神經末梢→三叉神經→腦幹
- ✧ 利用調控子 (mediator) 與分解酶 (degradative enzyme) 使細胞死亡
- ✧ 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





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

82

傳播途徑

- ✧ 李斯特菌廣泛分佈於自然界：土壤、腐生植物、糞便
- ✧ 感染的羊場之青貯料中，李斯特菌數為 10^7 CFU /公斤 [Fenlon, 1986]
- ✧ 人
 1. 食入易受汙染的食物：
蔬果、生乳、乳酪、肉品、熱狗、魚蝦及冰淇淋
 2. 胎盤



流行病學

- ✧ 少見於6週齡以下的仔羊
- ✧ 好發於4月齡以上的仔羊或2歲齡以上的成羊 [Barlow and McGorum, 1985]
- ✧ 常發生於6 ~ 8週齡的仔羊 [Green and Morgan, 1994]

→ 與青貯料的使用時間有關

- ✧ 大多數的腦炎病例皆出現在2~3月間

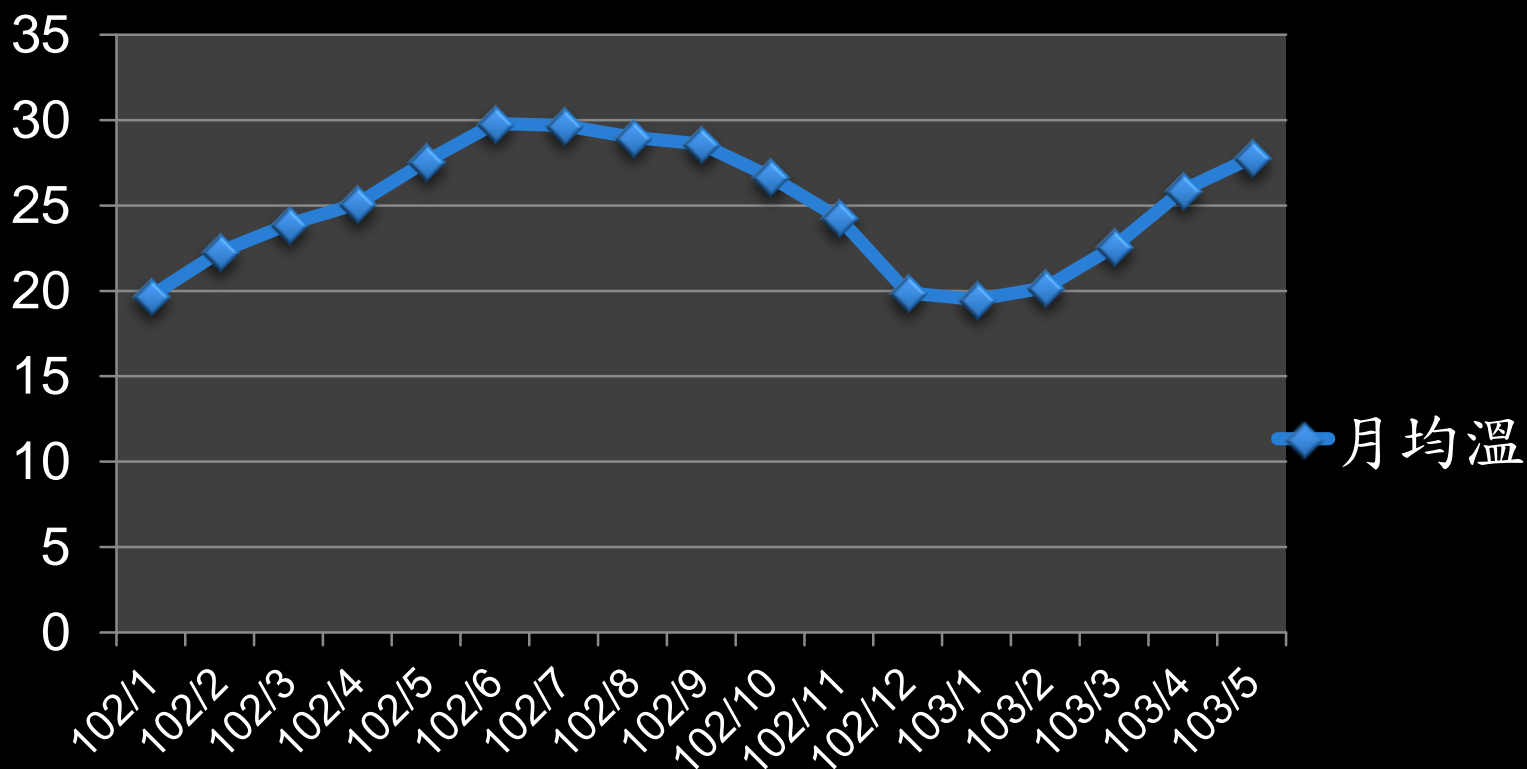


AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

流行病學

高雄市102-103月均溫





診斷及血清學的研究

✧ 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」：

1. 增菌培養

檢體：費氏培養液 (Fraser broth) → 1 : 9

2. 分離培養

改良式牛津培養基 (MOX)

3. 細菌鑑定

real-time PCR



診斷及血清學的研究

✧ 其他實驗室診斷方法

1. 免疫組織化學染色法 (IHC)
2. 原位雜合 (ISH)
3. 脫氧核糖核酸探針 (DNA probe)

✧ 本病例無分離到病原的原因？



公共衛生

- ✧ 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
- ✧ 家畜飼養業者、獸醫師
- ✧ 臨床病徵**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**30~35%**。



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

88

公共衛生

✧ 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

✧ 畜牧業者

1. 加強農舍清潔
2. 定期追蹤牛、羊的健康狀況
3. 接觸過動物後要加強洗手，尤其在碰觸流產的動物屍體



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

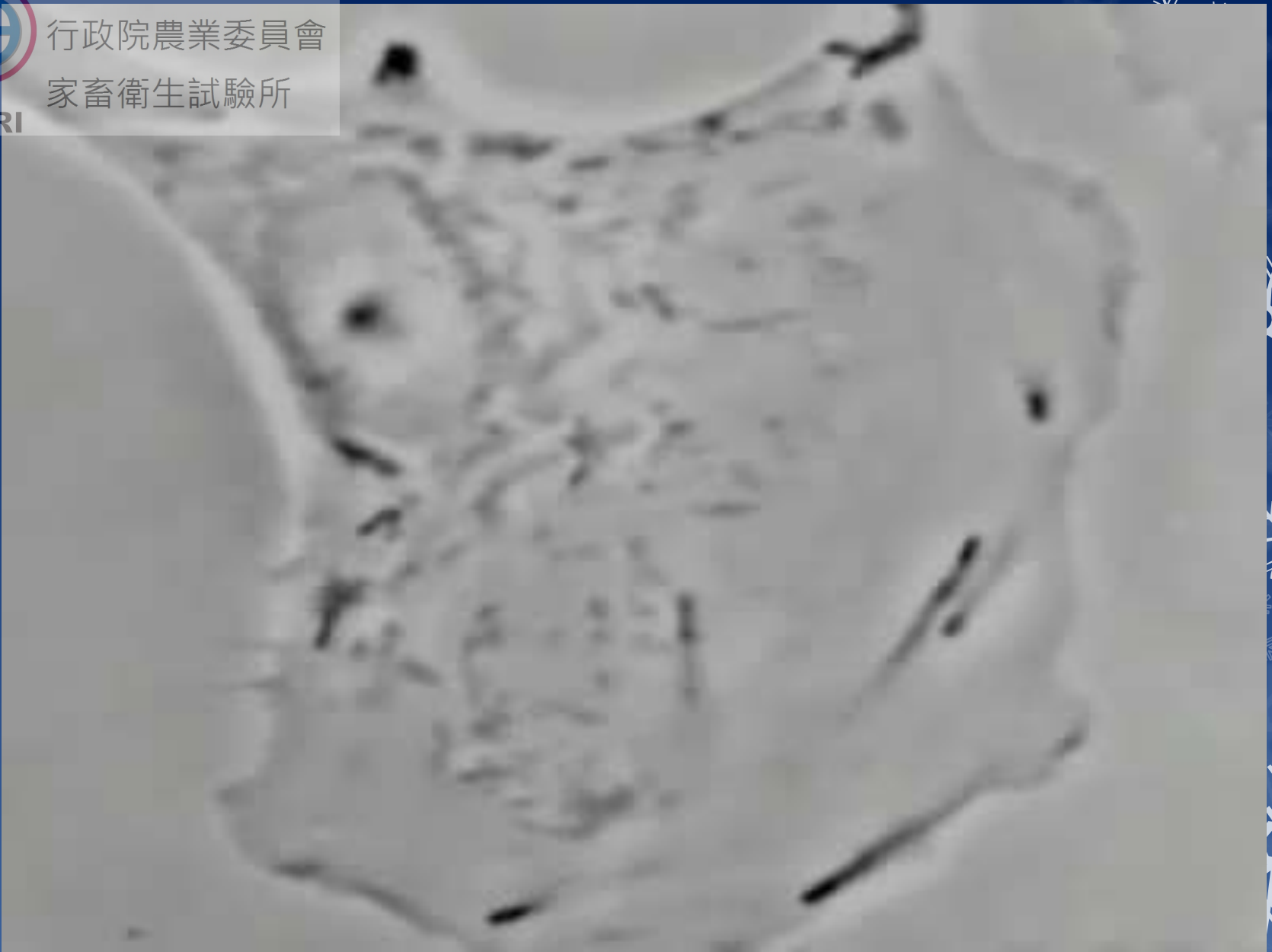


Thank you for listening



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

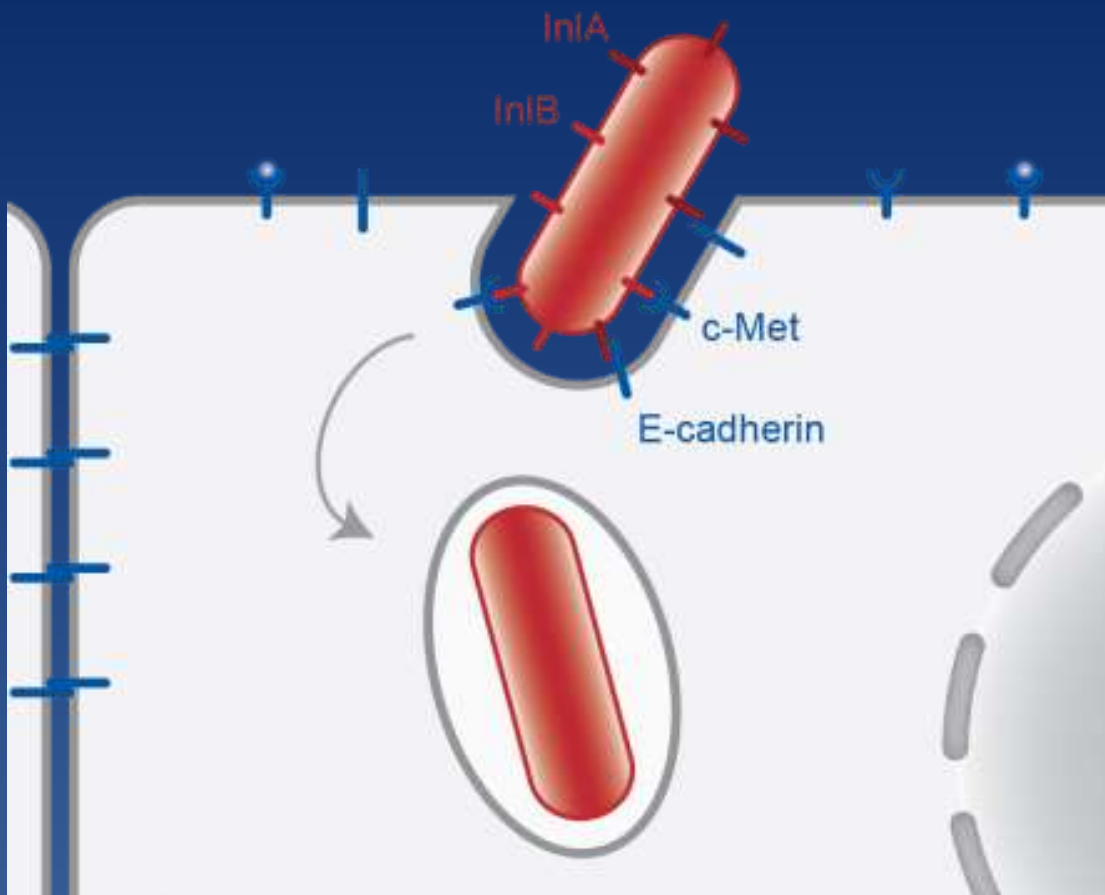




AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

92



[<http://alicelebreton.free.fr/research.html>]



行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

AHRI

93

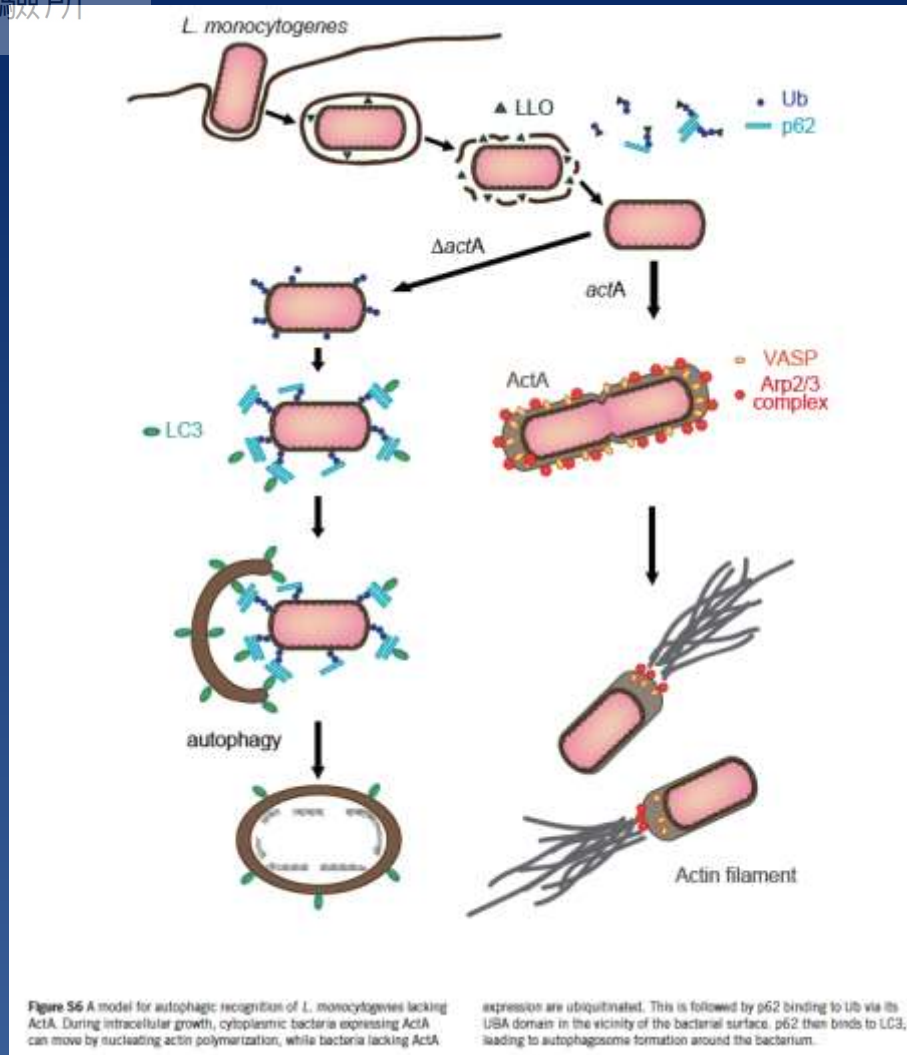


http://parasites.czu.cz/food/_data/192.jpg



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



<http://en.dogeno.us/wp-content/uploads/2009/12/Listeria-monocytogenes-ActA-mediated-escape-from-autophagic-recognition-model.png>

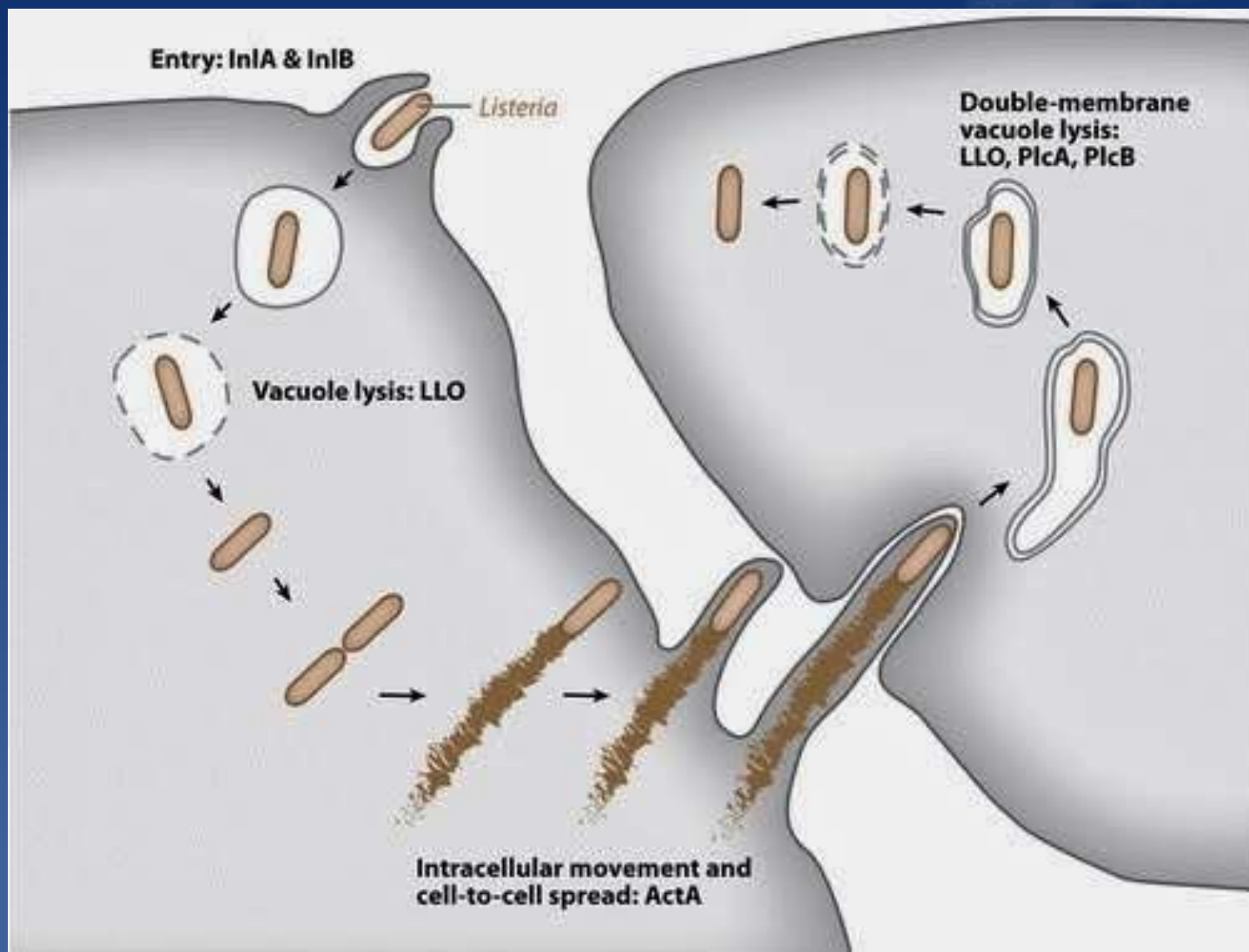


AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所



http://85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDI_Sdata/prods/4973-1_05463_0500_5000-2.jpg





AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

診斷及血清學的研究

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*



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

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



AHRI

行政院農業委員會
家畜衛生試驗所

99

診斷及血清學的研究

- ✧ 分子分型技術

1. PCR-RFLP

2. PFGE

- ✧ CDC 將李斯特菌列入 Pulse net 資料庫內，提供流行病學調查與早期監測