

投稿類別：農業類

篇名：「沙」「雞」重重-利用分子生物技術檢測牧場沙門氏菌之汙染

作者：

彭元翰。桃園市立龍潭高中。畜產保健科三年甲班。
詹千茹。桃園市立龍潭高中。畜產保健科三年甲班。
范姜莉婷。桃園市立龍潭高中。畜產保健科三年甲班。

指導老師：

徐銘辰老師

陳瑞玟老師

鄭孝全老師

壹、前言

一、研究動機

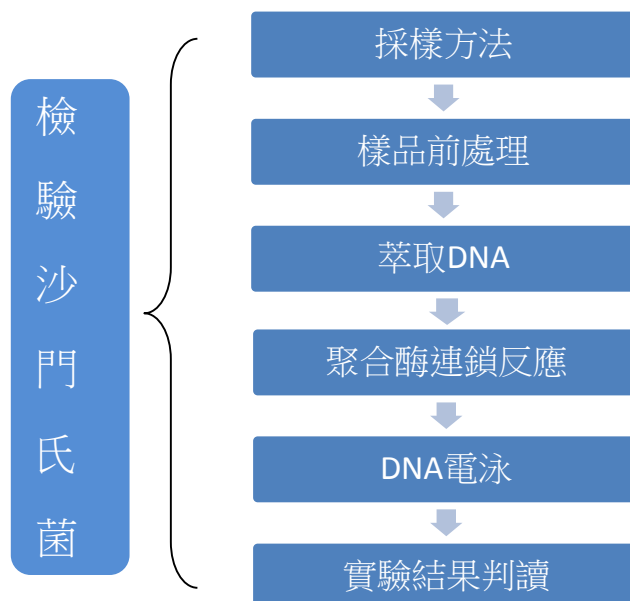
我們的牧場每一年都會配合動物飼養實習課程在學期初進雛雞飼養，今年也不例外，但是今年和以往不同的是，進雞 100 隻在第一週病死的雛雞將近十隻，到現在我們的雛雞死亡率已高達 50%，於是我們想了解有什麼因素導致小雞死亡率這麼高，也因此我們上網查詢許多導致雛雞死亡的可能原因，其中包括沙門氏菌所引起的雛白痢，於是我們用學校的分子生物實驗設備並且上網查詢相關之試驗設計及流程，檢驗目標從牧場環境到雛雞本身以確認是否感染沙門氏菌。

近年來衛生安全是國家為人民健康把關的第一目標，其中常見的肉品及蛋品衛生是國人最為重視。在台灣近幾年來，發生食安問題時有所見，例如曾發生多起沙門氏菌藉由食物感染中毒的案例，在 2017 年 7 月發生一起孩童打蛋未洗手而感染沙門氏桿菌，導致高燒腹瀉，甚至腸破洞。因此，如果我們能從牧場端開始把關，建立牧場環境及動物的健康監測平台，如此對於生產者來說能保障動物的健康，降低動物死亡的負擔成本，而對消費者的食品安全問題更能多一層保障。

二、研究目的

我們利用相關的實驗設備，操作 PCR 檢驗方法，在自己的牧場建立一套健康監測系統，去檢驗環境因素、雛雞本身，是否帶有沙門氏菌而影響到雛雞死亡率，去推論母體是否有垂直傳染的可能，並做到牧場端的衛生安全以及去了解現在的食安問題等。我們也希望透過這篇小論文來呈現我們的健康監測系統，去推廣這個系統帶來的方便及準確，讓牧場衛生安全做到最好。

三、研究方法



圖一：實驗流程

(圖一資料來源：研究者繪製)

貳、正文

一、介紹沙門氏菌

(一) 構造

「屬革蘭氏陰性，寬（ $1.5\sim 0.8\mu\text{m}$ ） \times 長（ $1.0\sim 3.5\mu\text{m}$ ），無莢膜和芽孢，大多具有周鞭毛，能利用鞭毛運動」（林哲祺，1984），除了雛沙門氏桿菌、雞沙門氏桿菌無鞭毛外，大多數具有菌毛，能吸附於宿主細胞表面。

(二) 特性

「適合生長的酸鹼值(pH)為 $6.5\sim 7.5$ 之間，在酸性環境（ $\text{pH}<4.5$ ），生長會受抑制。生存的溫度以 $35\sim 37^\circ\text{C}$ 最佳」（衛生福利部食品藥物管理署，2010）。耐熱性低， $60^\circ\text{C}/20$ 分鐘或 $100^\circ\text{C}/5$ 分鐘可將其殺死。

二、沙門氏菌感染細胞機制

「沙門氏菌大部分分布在動物腸道內，因此會直接汙染或經由鼠類、昆蟲汙染食物，再間接引起人類中毒。」（廖啟成、趙家馨，1988），沙門氏菌在感染細胞時，會先在自己的表面形成一個尖狀突起，用此建立和目標細胞間的接觸，接著專門的蛋白質會通過這個尖起抵達目標細胞，破壞目標細胞的細胞膜，穿出一個洞孔，最後沙門氏菌細胞通過洞孔向目標細胞釋放真正具有毒性的蛋白質，形成感染機制。

三、沙門氏菌感染來源

「感染的來源為受沙門氏菌屬細菌汙染之食物及飲水」（王景平等，1991），水、牛奶及其乳製品、乾燥或冷凍蛋、肉類及其肉製品、動物性染料等，這些都是沙門氏菌感染來源，而最終影響原因都是由糞便交叉汙染而導致的。

四、沙門氏菌影響的事件

沙門氏桿菌在食品中毒案件中，韓國及美國佔第一位，日本佔第二位，國內佔第四位，在英國及日本的中毒案件中，大部分是經由蛋類傳染，則國內大部分是經由禽肉傳染較多。「英國 1989 年在 221 次沙門氏菌中毒案件中，有 28 次是經由食品媒介，當中有一半是由蛋媒介。」（衛生署，1998），感染途徑可能是因為禽類吃了受到沙門氏菌汙染的飼料而被感染後，再感染到蛋內。

五、雛雞受沙門氏菌影響死亡率高的原因

(一) 環境因素

沙門氏菌的傳播方式是橫向傳播。橫向傳播，為任何有可能攜帶沙門氏菌的物體被至於雞群之中，這些包括：飲水、墊料、糞便、被污染的日用品和飼料等，這些都是受沙門氏菌影響而死亡的环境因素。

(二) 雛雞本體

據調查動物臟器及其他部位沙門氏菌的檢出率：肝臟為 85%，脾臟為 83%，腎臟為 75%以及其他的臟器。家禽蛋類沙門氏菌的檢出率為 0.5%，如果蛋雞本體已帶菌則其生產之雞蛋帶菌率則高達 100%。實驗證明，沙門氏菌可經母雞本身等階段再轉遞給雛雞，存活於雛雞終生。

六、沙門氏菌引起的疾病

(一) 對人造成的疾病

1. 一般腸炎

通常在吃了受污染食物，經 6~48 小時潛伏期後，開始噁心、嘔吐，接著腹痛、腹瀉，便中可能帶血。常見由鼠傷寒沙門氏菌 (*S.typhimurium*) 及腸炎沙門氏菌 (*S.enteritidis*)。

2. 傷寒、副傷寒、其他腸熱病

沙門氏菌所引起疾病中最嚴重的。傷寒、副傷寒分別由傷寒桿菌、副傷寒桿菌所造成，潛伏期約 7~12 天，症狀先是便秘、發高燒，接著腹痛、譫語、肝脾腫大、帶血性腹瀉等。

(二) 對雞隻造成的疾病

1. 雛白痢 (*pullorum disease*)

雛白痢沙氏桿菌 (*Salmonella pullorum*)，感染雛禽引起的急性敗血症，成禽多為不顯性感染。因為罹病雛禽排出灰白色下痢便，故名雛白痢。最常出現病灶的器官依序為：肝、肺、心、肌胃、盲腸。急性期以肝、脾腫大，各臟器充出血為主，雞雛白痢是家禽產業中重要的血清型。

2. 家禽傷寒 (*Fowl typhoid*)

由雞傷寒沙門氏菌引起，雛雞感染後常見顫抖、喘息及眼瞼腫脹等症狀，常猝然倒地而死，故有「猝倒病」之稱。

3. 禽傷寒

本病常發生於中雞、成年雞和火雞，在年齡較大的雞和成年雞，急性經過者突然停食、精神萎頓、排黃綠色稀糞、羽毛松亂、冠和肉髯蒼白而皺縮，體溫上升 1-3 °C，病雞會迅速死亡。

七、實驗過程

採樣方法

1. 雞隻飼料：開封使用過的飼料裝入離心管，大約與培養液 19 的量
2. 雞隻墊料：肉雞使用過的墊料取一部分裝入離心管，大約與培養液 1：9 的量
3. 雨鞋：用手套，塗抹同一雙雨鞋的鞋底，再將手套裝入無菌袋中
4. 堆肥室地板：用手套塗抹固定的 15x15 平方公分的地面，再將手套裝入無菌袋中
5. 雞隻泄殖腔：將要採樣的雞隻做記號，用無菌棉花棒沾取 DDW，塗抹雞隻泄殖腔，再將棉花棒裝入離心管中
6. 雞糞：用無菌棉花棒沾取 DDW，塗抹新鮮的雞糞，再將棉花棒裝入離心管中
7. 雞隻飲用水：用無菌棉花棒沾取肉雞的飲用水，在將棉花棒裝入離心管中
8. 牛舍出入門：用無菌棉花棒沾取 DDW，塗抹固定的 15x15 平方公分的地面，再將棉花棒裝入離心管中
9. 死雞的肝臟：使用剪刀和聶子，先用酒精把死雞表面噴濕，再從嘴巴開始往下剪，要注意避開嗉囊，邊剪邊把皮剝開，整個內臟分離出來後，剪取目標肝臟

樣品前處理

1. 雞隻飼料：將雞隻飼料 33.489g，加入 301g 的培養液，放入迴轉培養機內，進行培養
2. 雞隻墊料：將雞隻墊料 49.959g，加入 50g 的培養液，放入迴轉培養機內，進行培養
3. 雨鞋
4. 堆肥室地板
5. 雞隻泄殖腔
6. 雞糞
7. 雞隻飲用水
8. 牛舍出入門
9. 死雞的肝臟：取出肝臟，表面噴灑酒精，再用打火機燒，把表面的菌燒死，用剪刀稍微剪開肝臟，讓肝臟內的菌更好培養再泡入培養液中，放入迴旋培養箱 37°C 搖菌 24 小時



圖二:死雛雞樣本
(圖二資料來源:研究者拍攝)



圖二:死雛雞肝臟樣本
(圖二資料來源:研究者拍攝)

引子

(1) 偵測雛白痢沙門氏菌 (SP) 引子:

SGP-F (5'- CGG TGT ACT GCC CGC TAT -3')

SGP-R (5'-CTG GGC ATT GAC GCA AA-3'), 預期產物大小為 252 bp。

(2) 偵測鼠傷寒沙門氏菌 (ST) 及腸炎沙門氏菌 (SE) 引子:

invA-F 5'GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA -3'

invA-R 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'

目標產物為 284bp

依照下表比例, 將反應試劑與 DNA 加入 PCR 試管中

檢測沙門氏菌

檢測雛白痢沙門氏菌 (SP)

PCR 反應液	1 管 (μL)	PCR 反應液	1 管 (μL)
2x Master Mix	10	2x Master Mix	10
10 μM invA Primer-F	1	10 μM SPG Primer-F	1
10 μM invA Primer-R	1	10 μM SPG Primer-R	1
Template (DNA)	5	Template (DNA)	5
Sterile ddH ₂ O	3	Sterile ddH ₂ O	3
Total	20	Total	20

聚合酶連鎖反應

D
N
A
電
泳

(1) 配置 1% agarose 電泳膠

a.7x7 cm 膠片：秤取 0.2 g agarose 溶於 20 mL 1x TAE 緩衝液中於微波加熱沸騰，置於 60°C 水浴中降溫後，加入 2 μ L Syber Green 混合均勻，倒入鑄膠器，以鋁箔紙覆蓋避光待凝固。

b.15x15 cm 膠片：秤取 1g agarose 溶於 100 mL 1X TAE 緩衝液中於微波加熱沸騰，置於 60°C 水浴中降溫後，加入 10 μ L Syber Green 混合均勻，倒入鑄膠器，以鋁箔紙覆蓋避光待凝固。

(2) 將膠片置入電泳槽內，倒入 1x TAE 緩衝液，蓋過膠片。

(3) 注入 7 μ L 分子量標示物（已包含 loading dye）。

(4) 再取 5 μ L PCR 產物依序注入電泳膠的不同孔中。

(5) 蓋上電泳槽蓋子，設 100V 電壓以鋁箔紙覆蓋避光

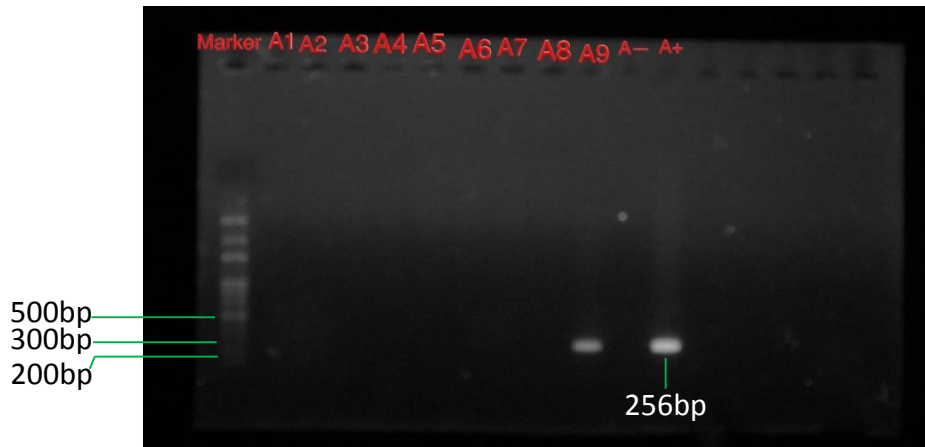
a.7x7 cm 膠片：跑 40 分鐘

b.15x15 cm 膠片：跑 60 分鐘

(6) 將電泳膠取出來，放入中 UV 照膠設備

八、實驗結果

(一) 第一次沙門氏菌進行 PCR 反應產物電泳圖



圖四：電泳圖

(圖四資料來源：研究者拍攝)

(A1) 飼料 (A2) 墊料 (A3) 雨鞋 (A4) 堆肥室地板 (A5) 雛雞泄殖腔 (A6) 雛雞糞便 (A7) 雛雞飲用水 (A8) 牛舍出入口 (A9) 死雛雞肝臟 (A-) 沙門氏菌陰性 (A+)沙門氏菌陽性

圖四.首行為 DNA Marker；A1-A8 為牧場環境的採樣樣本，未檢測出含有沙門氏菌；A9 為死雛雞肝臟，有檢測出含有沙門氏菌；A-為沙門氏菌陰性對照組；A+為沙門氏菌陽性對照組

PCR 產物大小為 256bp

(二) 第二次沙門氏菌進行 PCR 反應產物電泳圖



圖五：電泳圖

(圖五資料來源：研究者拍攝)

(S1) 牛舍出入口 (S2) 雛雞的飲用水 (S3) 堆肥室 (S4) 雛雞的泄殖腔 (S5) 雨鞋
(S6) 雛雞糞便 (S7) 雛雞墊料 (S8) 雛雞飼料 (S9) (S10) (S11) 死雛雞肝臟

圖五.首行為 DNA Marker；S1-S8 為牧場環境的採樣樣本，未檢測出含有沙門氏菌；
S9-S11 為死雛雞肝臟，檢測出含有沙門氏菌；S-為沙門氏菌陰性對照組；S+為沙門
氏菌陽性對照組

PCR 產物大小為 256bp

(三) 第二次雛白痢進行 PCR 反應產物電泳圖



圖六：電泳圖

(圖六資料來源：研究者拍攝)

(P1) 牛舍出入口 (P2) 雛雞的飲用水 (P3) 堆肥室 (P4) 雛雞的泄殖腔 (P5) 雨鞋
(P6) 雛雞糞便 (P7) 雛雞墊料 (P8) 雛雞飼料 (P9) (P10) (P11) 死雛雞肝臟

圖六.中首行為 DNA Marker；P1-P8 為牧場環境的採樣樣本，未檢測出含有雛白痢；
P9-P11 為死雛雞肝臟，有檢測出含有雛白痢；P-為雛白痢陰性對照組；P+為雛白痢陽
性對照組

PCR 產物大小為 284bp

樣品編號	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
沙門氏菌	—	—	—	—	—	—	—	—	+
樣品編號	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9-S11
沙門氏菌	—	—	—	—	—	—	—	—	+
樣品編號	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9-P11
雛白痢	—	—	—	—	—	—	—	—	+

表一：實驗結果總表
 (+表示陽性，—表示陰性)
 (表一資料來源：研究者繪製)

參、結論

一、實驗結果判讀

整體實驗結果如表一，在表中可以很明確的發現 A1~A8、S1~S8、P1~P8 是牧場環境，檢驗出結果均為陰性反應，表示無沙門氏菌汙染；而 A9、S9~S11 為死雞肝臟，其結果為沙門氏菌陽性反應並且由 P9~P11 結果顯示為雛白痢陽性反應。另外，電泳結果探討方面，圖四是第一次實驗結果，A1-A8 為牧場環境的採樣樣本，未檢測出含有沙門氏菌；A9 為死雞雞肝臟，有檢測出含有沙門氏菌。雖然牧場環境沒有檢測出來，我們推測有可能是因為環境不夠潮溼或是採樣的克數不夠，另外也考慮到操作上的誤差，因此我們做了第二次實驗，其中包含了死雞雞肝臟(A9)的第二次 PCR 反應及 DNA 電泳。圖五為第二次實驗結果，S1-S8 為牧場環境的採樣樣本，仍然未檢測出含有沙門氏菌；S9-S11 為前次死雞雞肝臟，一樣檢測出含有沙門氏菌，並且由圖六結果得知其為讓雞隻致死率提高的雛白痢。第二次牧場採樣點，我們挑了比第一次更潮溼的地方(水禽舍)，但結果依然檢測不到沙門氏菌，有可能是因為菌的濃度不夠，也顯示牧場飼養動物單純及清潔確效完整而無汙染問題。之後的試驗我們可以從採樣的方法及對象、採樣工具的使用及操作流程進行改善。

二、牧場動物健康的把關

在此次的實驗結果，我們初步完成了第一階段目標，找到牧場雛雞死亡最可能的原因-雛白痢的感染，然而牧場的環境並無沙門氏菌汙染的顯著結果，因此推論雛雞來源的牧場可能是沙門氏菌汙染的源頭。由此實驗結果讓我們更加深建立牧場健康監測系統是台灣經濟動物牧場所勢在必行，尤其這套系統是由簡單並快速的分子生物實驗即可完成，若一般牧場能有這套系統，就不用花大量的時間與資金特地送到相關的檢驗單位，並可以利用自家牧場的平台先進行重大疾病的篩選。我們在這次的實驗中監測到雛雞的肝臟含有的大量沙門氏菌，除了可能受環境影響也不排除是母雞帶原，進一步的去選擇優良的母雞來源，平時也做好牧場的消毒工作，也在動物飼養實習課程中去配合牧場健康監測系統，更加能落實牧場安全衛生，如果消費者在消費時，能直接了解產品在牧場就已經有第一層把關，就能使消費者對買到的產品更加信任，使農產品安全衛生提升。

肆、引註資料

王景平、陳志輝等（1991年）。**醫用微生物學（上冊）**。藝軒圖書

廖啟成、趙家馨（1988年）。**食品安全**。新竹市:食品工業發展研究所

林哲祺（1984年）。**獸醫臨床細菌鑑定圖譜**。藝軒圖書

衛生署（1998年）。疫情報導－沙門氏菌與食品中毒。2019年9月18日，取自
<https://www.cdc.gov.tw/File/Get/8eixEu4hFdwLcGwe94fAKQ>

每日頭條。沙門氏菌病（雞白痢、禽副傷寒、禽傷寒）的治療方案。2019年9月18日，取自
<https://kknews.cc/zh-tw/health/zkzxkg.html>

衛生福利部食品藥物管理署（2010年）。沙門氏桿菌。2019年9月18日，取自
<https://www.fda.gov.tw/tc/siteContent.aspx?sid=1942>