

台灣地區反芻動物 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 之盛行率調查

黃春申*、蔡洵洵、官南綾、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為調查台灣地區草食動物 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) 之感染情形，對乳牛、乳羊以酵素免疫吸附試驗 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，對其他反芻動物以補體結合試驗 (complement fixation test; CFT) 進行血清抗體檢驗，此外並採上述乳牛場乳牛糞便進行病原分離。結果ELISA之陽性率在乳牛場為9.4% (188/2,010)，在乳羊場為2.7% (31/1,154)，場陽性率在乳牛與乳羊分別為76.1% (51/67) 及37.5% (18/48)；CFT之陽性率在長鬃山羊為25.0% (3/12)，羊駝為33.3% (1/3)；乳牛糞便病原分離陽性率為1.8% (7/380)，場陽性率18.4% (7/38)。綜合以上顯示MAP的確在台灣乳牛、乳羊及其他反芻動物群中流行，本結果將有助於建立本病之流行病學基礎資料及將來的控制計畫。

關鍵詞：副結核病、約尼氏病、盛行率

緒言

副結核病 (paratuberculosis 或稱約尼氏病 Johne's disease) 是由鳥型分枝桿菌副結核亞型 (*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*; MAP) 所引起之反芻動物慢性下痢性疾病，遍布世界各地造成嚴重之經濟損失[10,14]。帶原動物移入健康群體後會造成此病的難以消滅，感染途徑主要是食入環境中MAP所污染之食物，包括污染之乳汁。本病臨床症狀主要是慢性漸進性消耗及下痢；牛隻被感染後，隨病程演進及個體差異，病畜可能完全排除病原，或是持續性感染變成外表健康的次臨床期動物。而在其他小反芻獸，下痢比較少見。小腸的病灶會造成蛋白質漏失及吸收不良症，導致產乳量下降及肌肉消耗等畜產經濟損失[7,10]。

本病檢測方法有糞便抹片、糞便及組織細菌分離、糞便與組織的DNA探針、血清學、屍體解剖以

及組織病理學[10,11]。實驗室分離MAP需要接種於含分枝桿菌素 (mycobactin) 之蛋黃培養基，培養時間需要12週或更久時間，分枝桿菌素依賴性一直被當成副結核分枝桿菌之重要鑑定依據。血清及乳汁抗體檢驗亦是重要的診斷工具，包括補體結合試驗 (complement fixation; CF)、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 以及AGID (agar gel immunodiffusion)，牛隻檢驗以ELISA的敏感性最高，小反芻獸則以AGID最為敏感[6,10]。

近年藉由細菌培養技術的改進及PCR技術的應用，證實某些人類克隆氏病 (Crohn's disease) 病患的組織中有副結核分枝桿菌之存在，以及患者檢出副結核陽性抗體，因此推測此兩種疾病間可能有某程度的關連[9]。

國內對於副結核病的調查，於1976年由澳洲

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

進口肉牛進行CF試驗，有5.4% (156/2,907) 為陽性[2]；1987年以ELISA調查8縣市牛隻，結果有3.5% (35/1,003) 為陽性[3]；1998年以ELISA調查，結果抗體陽性率在牛為6.9% (132/1,921)，在羊為2.0% (36/1,815) [1]。2001年對牛隻糞便進行病原分離，結果陽性率在北部為0% (0/105)、中部為1.9% (7/360)、南部為2.0% (10/493)、東部為2.4% (1/42)，總陽性率為1.8% (18/1,000)，牧場陽性率為7.1% (12/170) [4]。2004年蔡等對屠宰場516頭牛隻進行分析，結果糞便病原分離陽性率為3.5% (18/516)，血清CFT陽性率為12.4% (64/516)，若以病原分離為診斷標準，CF敏感性為100% (18/18)，特異性為90.8% (452/498)。由於近五年台灣地區草食動物MAP感染情形並未再有完整之調查，故進行本研究，並希望研究結果將有助於作為本病流行病學之基礎資料，以提供防疫單位擬定未來之控制計畫。

材料與方法

材料來源

牛隻血清來源為2008年底至2009年各縣市防治所為檢測牛流行熱所隨機抽檢乳牛場之血清，包括北部15場、中部23場、南部25場和東部4場共67場，每場30頭共2,010頭血清樣本。乳牛糞便來源為前述血清試驗之陽性牧場每場隨機採取10份新鮮糞便，計38場380件樣本。乳羊血清樣本為2009年底至2010年各縣市防治所為檢測Q熱所隨機抽檢乳羊場之血清，包括北部12場259頭、中部8場188頭、南部20場565頭、東部7場112頭、澎湖1場30頭，合計48場1,280頭。另外協助北部某牧場檢測各種反芻動物血清抗體，包括12頭長鬃山羊、7頭梅花鹿、4頭駱馬、4頭山羌、3頭羊駝、2頭山羊以及水鹿、水牛、黃牛、弓角羚羊、單峰駱駝各1頭，共37頭。

ELISA

牛隻與羊隻血清使用市售之間接型ELISA副結

核抗體檢測套組 (PARACHECK®, Australia)，依其操作手冊進行，於血清稀釋時添加之稀釋液為含有 *M. phley* 之抗原，目的為降低環境性分枝桿菌造成之非特異性反應，其餘試驗步驟參考其操作手冊。

盛行率計算

本研究中以商品化之ELISA套組檢驗所得之盛行率即為表面盛行率 (apparent prevalence; AP)，若要推估真實盛行之情況，可代入由 Rogan 及 Gladen 於 1978 年所提出之公式 – 真實盛行率 (True prevalence; TP) = (AP + 特異性 - 1) / (敏感性 + 特異性 - 1) 中，便可計算出 TP。依照套組說明書所示敏感性 65%、特異性 100% 計算，TP 即為 AP / (65%)。

補體結合試驗

其他反芻動物血清採用補體結合試驗[10]，其操作步驟係將待測血清及標準陽性血清於 58°C 水浴槽中非働化 50 分鐘後，再 5 倍稀釋。將稀釋血清加於 96 孔 U 型盤實驗孔中，連續兩倍稀釋，倍數依序為 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 及 1:320，再依序加入抗原、補體。另設置抗補體對照孔，除以緩衝液取代抗原添加外，其餘配置與 1:5 實驗孔完全相同。37°C 30 分鐘充分感作後，添加敏感紅血球然後置於 37°C 30 分鐘充分作用。移回 4°C 2-3 小時使未溶之血球沉澱。當抗補體對照孔出現 50% 以上不溶血時，此樣本結果為無法判定。當抗補體對照孔完全溶血且實驗孔出現 50% 以上不溶血即判為陽性，產生陽性之最高稀釋倍數即為待測血清之力價。

病原分離

將採集之糞便依照 OIE 建議操作步驟進行 MAP 分離，步驟為糞便與蒸餾水混合後靜置讓雜質沉澱，之後吸取上清液與 hexadecylpyridinium chloride (HPC) 混合後置於室溫作用 18 小時，以沉澱物接種於含及不含 mycobactin 之兩種 Herrold's 斜面培養基，培養時間 14 週或是更久，若菌落只長於含 mycobactin 之培養基卻不長於不含 mycobactin 之培養基，再輔以分子生物學診斷方法，即可確定為

MAP[10]。

結果

ELISA 之陽性率在乳牛場為 9.4% (188/2,010)，在乳羊場為 2.7% (31/1,154)，場陽性率在乳牛與乳羊分別為 76.1% (51/67) 及 37.5% (18/48) (如表 1、表 2)；CFT 檢查某場 37 隻各類反芻動物血清抗體陽性率在為長鬃山羊 25.0% (3/12)，羊駝為 33.3% (1/3)，4 頭駱馬無法判定結果，其餘 18 頭動物皆為陰性；在牛糞便之 MAP 分離上，陽性率為 1.8% (7/380)，場陽性率 18.4% (7/38)。

討論

由本次血清結果可知台灣乳牛盛行率約 9.4%，明顯高於歷年檢測結果，依照套組之敏感性特異性推算，真實感染情形應達 15%，推測由於長期不重視本病的結果，造成很多染病但是外表健康的動物在牧場間流通，這些次臨床期牛隻會由糞便持續排出不等量的病原污染牧場環境，現今陽性場比例已高達 76%，這些感染牛可能會有不易察覺之產乳下降及逐漸消瘦，畜產經濟損失嚴重而不自知。另外由於近年乳價高漲，很多農戶捨不得淘汰牛隻，這些具臨床症狀之動物會排出大量病原污染場地及感染其他動物，亦是造成本病散播的原因之一。本病為世界性疾病，以乳牛而言在歐洲盛行率 3-20%，場陽性率 50% 以上；在美國依地區不同，盛行率為 2.5-17.1%，場陽性率 41-66%；澳洲盛行率 1.9%，場陽性率 7% [13]，由此可知，本病在全世界造成之經濟損失極為巨大且無法估計。

乳羊血清抗體結果顯示在羊場與羊隻分別為 37.5% 及 2.7% 的陽性率，相較過去之檢驗結果並

未有明顯改變，但有近四成乳羊場已被污染，原因應與乳牛相同，染病動物難以檢出，所以在牧場間買賣流通，而羊隻下痢通常較不嚴重，難由臨床症狀判別。另外於本研究中，長鬃山羊與羊駝亦為副結核病抗體陽性，之後亦將採取其糞便進行病原分離。

細菌分離在技術上具有難度並且相當花時間 (約 14 週或是更久)，但是細菌分離仍是唯一不會有偽陽性問題的方法。以固體培養基自感染動物糞便分離 MAP 的方法只能檢測出約 30% 感染的動物，若是已有臨床症狀之動物，分離率會接近 100% [10]。

由於早期感染及次臨床期動物既無臨床症狀，若以目前血清學及其他檢驗方法亦常無法檢出 [5,8,12]，因此本病在於早期篩出上極為困難，疾病控制上相當不容易，撲滅計畫更是難有成效，因此如何控制本病是國際上所共同面臨的難題。在牧場中有一頭臨床病症的動物出現時，代表著有一群動物已被感染。故應是徹底地進行環境衛生清潔，儘量由陰性場引進未感染之動物，並且儘快篩出並淘汰感染動物，乳汁殺菌後再給予仔牛食用，避免糞便中病原污染食料造成牧場內循環感染，逐漸降低本病造成之危害。本病出現臨床症狀者通常無法復原，會慢性消瘦後死亡，曾有病例用多種抗生素後雖可改善症狀，但無法治癒，因此確定感染之動物應予淘汰，不應將動物續留於牧場中污染環境。目前國際上有副結核病的死菌疫苗可以有效減少臨床症狀，但卻無法防止感染，且疫苗施打後可能引起過敏反應，或是干擾牛結核病的結核菌素試驗結果，可能影響結核病的診斷及控制，因此目前不建議施打疫苗 [10]。

表 1、以 ELISA 檢測台灣各地乳牛 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 感染之表面盛行率及真實盛行率。

	地區				總數
	北部	中部	南部	東部	
表面盛行率					
場陽性率(%)	93.3 (14/15)	52.2 (12/23)	80 (20/25)	100 (4/4)	76.1 (51/67)
牛隻陽性率(%)	8.0 (36/450)	3.9 (27/690)	13.7 (103/750)	18.3 (22/120)	9.4 (188/2010)
真實盛行率					
場陽性率(%)	100	80.3	100	100	100
牛隻陽性率(%)	12.3	6.0	21.1	28.2	14.5

表 2、以 ELISA 檢測台灣各地乳羊 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 感染之表面盛行率及真實盛行率。

	地區					總數
	北部	中部	南部	東部	澎湖	
表面盛行率						
場陽性率(%)	50 (6/12)	12.5 (1/8)	55 (11/20)	0 (0/7)	0 (0/1)	37.5 (18/48)
羊隻陽性率(%)	3.9 (10/259)	0.5 (1/188)	3.5 (20/565)	0 (0/112)	0 (0/30)	2.7 (31/1154)
真實盛行率						
場陽性率(%)	76.9	19.2	84.6	0	0	57.7
羊隻陽性率(%)	6.0	0.8	5.4	0	0	4.2

參考文獻

1. 林郁婷、潘漢恩、蔡向榮。台灣地區牛羊副結核病及山羊藍舌病之抗體調查。中華獸醫誌。27: 256-261, 2001。
2. 呂榮修、李永林、黎南榮、黃士則、林榮福、鄭建盛、邱朝齊、陳守仕。進口牛之牛胸膜性肺炎、布氏桿菌、牛副結核病之抗體調查。中華獸醫誌。2: 72-75, 1976。
3. 呂榮修、蔡向榮、鄺懋勁、賴淑雅、李永林、林地發、李全。以酵素結合免疫吸附法調查台灣牛副結核病抗體。中華獸醫誌。13: 11-15, 1987。
4. 郭晉禾。副結核分枝桿菌在台灣地區乳牛群之分佈。國立台灣大學獸醫學研究所碩士論文, 2001。
5. Bannantine JP, Bayles DO, Waters WR, Palmer MV, Stabel JR, Paustian ML. Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Proteome Sci*, 6:5, 2008.
6. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12:685-92, 2005.
7. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev*, 14:489-512, 2001.
8. Nielsen SS. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Microbiol*, 132:274-282, 2008.
9. Mendoza JL, Lana R, Díaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 15:417-422, 2009.
10. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2008- chapter 2.1.1.1- Paratuberculosis (Johne's disease). 2008.
11. Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P, Buergelt CD. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transbound Emerg Dis*, 55:125-133, 2008.
12. Shin SJ, Cho D, Collins MT. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*, 15:1277-1281, 2008.
13. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J*, 47:874-882, 2006.
14. Woodbine KA, Schukken YH, Green LE, Ramirez-Villaescusa A, Mason S, Moore SJ, Bilbao C, Swann N, Medley GF. Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south west England. *Prev Vet Med*, 89:102-109, 2009.

Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in Ruminants in Taiwan

CS Huang*, SS Tsai, NN Kuan, C Tu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract To investigate the infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Taiwan, we performed serological test of dairy cattle and goats using a commercially-available ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit and isolated MAP from dairy herd fecal samples. The prevalence of MAP was 9.4% (188/2,010) and 2.7% (31/1,154) in cattle and goats, respectively, and 76.1% (51/67) of the dairy herds and 37.5% (18/48) of the dairy goat having at least one positive animal. The prevalence of MAP in fecal samples was 1.8% (7/380), and the herd prevalence of MAP positive fecal samples was 18.4% (7/38). In addition, the serum samples of other ruminants were analyzed by complement fixation test (CFT), showing that 25.0% (3/12) of Formosan Serow and 33.3% (1/3) of Alpaca tested were CFT positive. Our findings indicated that MAP is endemic among dairy cattle, goats, and other ruminant populations in Taiwan. The data are instrumental in the establishment of epidemic distribution patterns and in designing future control programs of paratuberculosis in ruminants.

Key words: *Paratuberculosis, Johne's disease, Prevalence*