



# 101 年牛結核病 調查報告

黃春申、蔡洵洵、涂堅 本所生物研究組

### 緒言

牛結核病 (Bovine Tuberculosis) 為人畜共通性疾病，病原為牛型分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*)，牛為其自然宿主，感染後病灶主要位於頭胸部淋巴結或腸繫膜淋巴結，會產生肉芽腫性、乾酪樣結節及鈣化等症狀，嚴重程度與感染量、感染途徑及感染時間有關，在世界各國畜牧業造成嚴重之經濟損失。傳播途徑包括吸入、食入或經由胎盤或傷口感染，吸入為主要之傳播途徑，吸入本菌感染之動物，病灶多侷限於肺臟周邊，當病程演進開始排菌時，也多是經由飛沫方式傳播給其他動物。幼畜和人類的感染則多是經由食入污染之牛乳，而造成腸道及肝臟等病灶。

在國際上，有牛結核病撲滅計畫的國家，大多採用皮內結核菌素測試 (Intradermal Tuberculin Test ; ITT)，ITT 可以篩檢出早期感染但病灶還沒出現之動物，也因此撲滅過程中，檢出之陽性牛隻常發現並不具有臨床結核病特徵，但以結核菌素試驗篩檢並且撲殺陽性牛隻在部分國家並不成功。

台灣自民國 45 年起針對乳牛以 ITT 進行檢測，陽性牛隻一律採取撲殺的策略，但直至目前仍未完全清除本病，因此本研究希望藉由初步的陽性場環境和牛隻個體採樣，以細菌的基因型分析和地域資料探究此菌於台灣的流行情形，希望藉此提供未來防治單位有效控制本病蔓延防治的對策。

## 材料與方法

### 材料來源

101 年度於 8 場 ITT 陽性場協同當地防疫機關人員進行血清與周邊環境之採樣，環境採樣點包括飼料槽、水槽、牧草、畜舍、運動場之土壤等 10 個點以上採樣點，將樣品攜回實驗室後進行分枝桿菌分離和核酸萃取以做後續的 PCR 試驗。此 8 場試驗場每 3 個月 ITT 檢測結果若為陽性之牛隻，將與防疫人員配合採取咽背淋巴結及其他重要淋巴結送至實驗室進行分枝桿菌分離。

### 分枝桿菌分離

將分離來源動物之臟器組織，剪碎後置入均質機專用的離心管 (gentleMACS C Tubes) 並加入商品化之 NALC-NAOH 去汙液 (BBL™ MycoPrep™ Mycobacterial System Digestion/Decontamination Kit)，離心管放入均質機內 (gentleMACS™ Dissociator) 以機器內建程序 (Lung, 8 seconds) 連續重複兩次均質。取出離心管於室溫下作用 15 分鐘，組織均質液體倒入 50 ml 離心管並加入無菌之 PBS 至離心管的 40 ml 刻度處，放入離心機以轉速 3,000 rpm 離心 10 分鐘。將上清液廢棄，留下約 5 ml 的均質液，以 10 µl 的無菌接種環沾取均質液接種在含 Glycerol 之 Lowenstein - Jensen medium (LJM-G) 及不含 Glycerol 之 LJW-w/o-G，放入含 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 培養箱培養。持續觀察 14 週，若出現白色或黃色針點狀菌落則以商業成品「抗酸細菌染色液套組」染色，抗酸染色陽性之菌落須進行後續 PCR 檢測步驟。

### 血清學檢測

前述 ITT 陽性牛場每場隨機採樣 30-35 頭牛血液，之後以市售 ELISA 套組 (BTB Ab ELISA 2.0, BIONOTE, Korea) 進行血清抗體檢測，再將血清學之結果和後續之結核菌素檢驗做一比對，以研究兩種檢驗結果是否一致。

### PCR 檢測

將疑似菌落溶入 200 µl 無菌水，以 95°C 10 分鐘進行不活化處理，再以 10,000 rpm 將菌體離心下沉，上清液便可進行 PCR。PCR 反應中所使用引子為依據 CDC 公告之結核菌特有 IS6110 序列所設計引子。若 PCR 結果為陽性



即判定菌株為結核菌。而環境樣本與鼻黏液拭子所萃取之核酸為提高敏感性進行巢式 PCR，第 1 次 PCR 方法與前述相同，而第 2 次 PCR 產物約為 300 bp。

### 結核菌基因分型

將分離所得之結核菌進行國際標準分型方法 Spoligotyping 分析，結果可與國際比較。

### 結果

血清學檢驗方面總計於屏東縣 4 陽性場共採血 140 頭乳牛，雲林縣 1 場陽性場採血 35 頭乳牛和嘉義縣 3 場陽性場 50 頭乳牛。結果在嘉義 A 場中檢驗出 3 頭陽性（編號 A3、A12、A17，血清陽性率 8.6%），其他全部為陰性。嘉義 A 場 3 個月後 ITT 檢驗時再次採樣牛隻血清 68 頭，結果 ELISA 陽性為 7 頭（陽性率 10.3%，A3 仍為陽性，A12、A17 轉為陰性），此次 ITT 陽性頭數為 33 頭（其中 9 頭送檢病原分離），同時 ELISA 與 ITT 皆陽性者只有 5 頭（其中 4 頭送檢病原分離，包括在前述 9 頭中），最終分離結果有 3 頭分離得牛型分枝桿菌（分離率 33.3%，此 3 頭為 ELISA 與 ITT 皆陽性者），A3 為 ITT 陰性、A17 為 ITT 陽性。後續兩次 ITT 檢驗，陽性頭數分別降為 2 頭、1 頭，ELISA 未再出現陽性。

總計 101 年嘉義縣 A 場與 B 場各分離得 3 株牛型分枝桿菌，進行 Spoligotyping 分析後以 <http://www.mbovis.org/> 資料庫比對，發現 A 牧場都是 SB0140 型（圖 1），而 B 場的牛型分枝桿菌有 SB0265（圖 2）與 SB1040（圖 3）兩型。此外，此次 7 場試驗場於環境樣本培養的結果方面皆未分離出牛型分枝桿菌。PCR 檢驗結果為屏東 4 場除 A 場只有水槽與飼料槽有陽性訊號外，其餘 B、C、D 場水槽、飼料槽及土壤全具陽性訊號。嘉義 A、B、C 3 場之水槽與土壤亦全具有陽性訊號。雲林僅於飼料槽有陽性訊號。

### 討論

血液學的 ELISA 檢測為一項簡單快速之方法，由於抗體的產生需要體內較多的病原，且比細胞性免疫發生晚，因此當陽性牛嚴重感染造成免疫抑制

時，有可能發生 ITT 檢測陰性但 ELISA 抗體陽性的情形。本次研究發現在一牧場中有牛隻出現 ELISA 陽性但 ITT 陰性的可能潛伏牛隻，而 3 個月後其 ITT 檢測轉變為陽性，但並無送檢分離病原；也出現 ELISA 陽性牛 3 個月後轉為陰性，ITT 檢驗變為陽性之牛隻，最後未分離得病原；也出現 ELISA 陽性牛 3 個月後轉為陰性，ITT 亦為陰性，由此可知此 ELISA 套組用於牛隻身上會有部分不規則情形，但套組未載明敏感性與特異性，故仍須累積資料才能判斷此套組之適用性。若比較此次 9 頭牛隻之分離結果，ITT 陽性且分離陽性者為 66.7% ( 6/9 )，ELISA 陽性且分離陽性者 25% ( 1/4 )，其餘資料仍為不足。嘉義縣 2 陽性場皆分離得 3 株牛型分枝桿菌，經過 Spoligotyping 分析後，其中 A 牧場都是 SB0140 型，是本所分析牛型分枝桿菌中所佔比例次高的一群菌株，佔 22.4%；而 B 牧場有 SB0265 型（目前本所分析牛型分枝桿菌中所佔比例最高的一群菌株，佔 70.6%）之外，還有分離得一特異性的型別 SB1040，就以往分離結果，同一場內並無出現過兩種型別菌株。另外值得注意的是 SB1040 此一特異性型別於 101 年 6 月同縣內另兩場新陽性場出現，根據地理位置分析，此兩場距離近（ 2 km 以內），但皆離嘉義 B 場 30km 以上且無與嘉義 B 場共用水源，因此靠風力汗水等環境因素傳播可能性較低，真正傳播之原因值得會同地方防疫單位深究，另外也不排除牛隻買賣之問題。至於 SB0265 與 SB0140 兩型皆為台灣普遍出現之基因型別，因此流行病學分析上較無法判別來源，因此需要嘗試分型效果更好之分子分型方法。以 PCR 針對陽性場環境中分枝桿菌偵測的結果顯示，環境中仍有包括土壤、水槽及飼料槽都有陽性訊號的出現，但並沒有培養出結核性分枝桿菌，此結果和國外相似，其他研究指出會出現這樣的結果表示環境中仍有結核性分枝桿菌的存在，其場內的陰性牛仍有受環境病原菌感染的風險，但因環境中也同時存有非結核性的分枝桿菌會擾亂結核性分枝桿菌的分離，因此要成功由環境中培養出牛型分枝桿菌非常困難。牧場中陽性牛無法清除的原因除環境中存在病原外，也有可能是潛伏性感染的牛隻對 ITT 不敏感或感染初期對結核菌素不反應導致無法徹底清除陽性牛而又造成其他牛隻感染。



圖 1、Spoligotyping 中的 SB0140 型，為台灣的次要流行型別，且流行於英國等歐洲國家。



圖 2、Spoligotyping 中的 SB0265 型，為台灣的主要流行型別，且流行於法、德、加拿大等。



圖 3、Spoligotyping 中的 SB1040 型，為台灣少見之型別，主要流行於南美洲巴西、墨西哥等。

### 參考文獻

1. 吳永惠。牛病學。藝軒，台北，141-145，1997。
2. 葉坤松。台灣南部地區結核病牛難以自感染場根除之原因探討。國立屏東科技大學獸醫學系碩士班碩士論文，2002。
3. Bengis, R. G.; Kriek, N. P.; Keet, D. F.; Raath, J. P.; de Vos, V.; Huchzermeyer, H. F. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*--sparrman) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort J Vet Res* 63(1):15-18; 1996.
4. Corner, L. A. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol* 112(2-4):303-312; 2006.
5. de Lisle, G. W.; Mackintosh, C. G.; Bengis, R. G. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech* 20(1):86-111; 2001.
6. Fine, A. E.; Bolin, C. A.; Gardiner, J. C.; Kaneene, J. B. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int* 2011:765430.
7. Haddad, N.; Ostyn, A.; Karoui, C.; Masselot, M.; Thorel, M. F.; Hughes,

- S. L.; Inwald, J.; Hewinson, R. G.; Durand, B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol* 39(10):3623-3632; 2001.
8. Jou, R.; Huang, W. L.; Chiang, C. Y. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14(3):515-517; 2008.
9. Milian-Suazo, F.; Harris, B.; Arriaga Diaz, C.; Romero Torres, C.; Stuber, T.; Alvarez Ojeda, G.; Morales Loredo, A.; Perez Soria, M.; Payeur, J. B. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Prev Vet Med* 87(3-4):261-271; 2008.
10. Morris, R. S.; Pfeiffer, D. U.; Jackson, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol* 40(1-2):153-177; 1994.
11. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. Ch2.4.7, 2011.
12. O'Reilly, L. M.; Daborn, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1:1-46; 1995.
13. Smith, N. H.; Dale, J.; Inwald, J.; Palmer, S.; Gordon, S. V.; Hewinson, R. G.; Smith, J. M. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25):15271-15275; 2003.

