

2014 年台灣牛型分枝桿菌基因型分析

黃春申*、涂 堅、蔡向榮

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 2013 年 10 月至 2014 年 10 月從 44 頭皮內結核菌素試驗(intradermal tuberculin test, ITT)陽性牛隻分離得 31 株 *Mycobacterium bovis* (陽性率 40.9%, 18/44), 動物有病灶之比率 36.4%(16/44), 有病灶之動物分離陽性率 87.5%(14/16)。31 株 *M. bovis* 之基因型依序為 SB0265 型 19 株(61.3%)、SB0140 型 10 株(32.3%)、SB1040 型 2 株(6.4%)。SB0265 型為主要流行菌株, 分布於全台; SB1040 型原本只於嘉義, 今年於新竹出現; SB0140 型往年出現於雲嘉屏, 但於屏東已消失三年, 今年再度出現。另外高密度陽性場區有兩區, A 區內陽性場相距不超過 1 公里, B 區內陽性場相距 5-8 公里, 相似處為同時具 SB0265 及 SB0140 兩個型別, 顯示感染源不只一個。

關鍵詞: 牛型分枝桿菌; 牛結核病; 基因分型

緒言

牛型分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*) 為人畜共通性病原, 牛為其自然宿主, 感染後會產生肉芽腫、乾酪樣結節及鈣化, 主要位於頭胸部淋巴結或腸繫膜淋巴結, 嚴重程度跟感染量、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、經由胎盤或傷口感染, 其中以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, 當病程演進至開始排菌時, 飛沫仍是主要傳播給其他動物的方式。幼畜和人類的感染則多是經由食入污染之牛乳, 可造成腸道及肝臟等相關病灶[5,6,7]。國際執行牛結核病撲滅計畫係採用皮內結核菌素測試, 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[6]。台灣自民國45年起以結核菌素皮內試驗進行乳牛檢測, 陽性牛隻一率撲殺, 但直至目前台灣地區仍未完全清除本病, 近年人型分枝桿菌感染人類病例增加快速[4], 與其極為相似且為人畜共通傳染性的牛型分枝桿菌亦受重視, 故此研究將以流

行病學角度分析牛型分枝桿菌感染場, 試圖解析本病原在台灣的主要流行現況。

材料與方法

材料來源

皮內結核菌素試驗(intradermal tuberculin test, ITT)陽性牛隻檢體採樣配合地方防治所人員進行例行性乳牛結核菌素檢驗並確定結果為陽性之動物, 並會同獸醫系教授團隊進行採樣, 將取得之樣品寄至本實驗室進行抗酸性染色、分枝桿菌的培養、核酸萃取及其他分生相關試驗。

分枝桿菌分離、培養與染色方法

ITT陽性檢體進行分枝桿菌之分離與培養, 併用傳統的LJ medium(Löwenstein-Jensen medium)系統(LJ w/o glycerol medium 3支與LJ medium 1支)及市售液體培養系統(MGIT™ 960 tube 1管), 以增加分離率。接種於MGIT™系統後, 每日以桌上型螢光偵測器觀察是否有因菌落生長產生之螢光反應, 持續觀察42日。陽性之培養液以抗酸染色觀察培養液是否有抗酸菌後, 將沉澱物萃取核酸以PCR

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

鑑定是否屬於分枝桿菌群，再將培養液接種於LJ medium二次確認。

核酸萃取

LJ medium上生長之菌落混於0.2 ml之無菌水及陽性MGIT™培養液之沉澱物以99°C加熱10分鐘處理後，10,000 rpm 離心1分鐘，上清液即可進行後續分生試驗。

PCR檢測

PCR反應中所使用引子(INS-1, 2, 3, 4)為依據結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex)IS6110設計之巢式聚合酶連鎖反應法[1]，若PCR結果為陽性即判定為結核菌。

結核菌基因分型

將已經確定為結核菌之菌株進行國際標準分型方法spoligotyping分析，試驗步驟依據疾病管制署公告之傳染病檢驗方法中結核菌群間隔寡核酸分子分型法[2]，所得出結果可區分出牛型或人型分枝桿菌，並可與國際資料庫比對[3,8]。

結果

2013年10月至2014年10月共檢驗20場次牛隻44頭，採集77個檢體，其中12場次檢出至少一株*M. bovis* (場分離率60%)，18頭動物29個檢體樣本由LJ分離得*M. bovis* (牛隻分離率40.9%，18/44；檢體分離率37.7%，29/77)。16頭動物之27件檢體有病灶(計算ITT陽性動物有病灶率36.4%，16/44)，其中25件分離為陽性(92.6%，25/27)，有病灶動物之陽性分離率為87.5% (14/16)，而分離陽性檢體中病灶率為80.6% (25/31)。而MGIT™則在77個檢體中檢出51個檢體為陽性(66.2%，51/77)，但再經PCR與LJ再培養測試，其中31件為陽性(40.3%，31/77)，包括前述29件LJ分離陽性與2件LJ分離陰性之檢體(表1)。乳牛*M. bovis* 31株之基因型分析，與國際資料庫網站比對後(www.mbovis.org)，基因型依序為SB0265型19株(61.3%，19/31)，SB0140型10株(32.3%，10/31)，

SB1040型2株(6.5%，2/31)(圖1)。每頭陽性牛隻僅分離得單一型別菌株，且每個陽性場僅單一型別流行，並無複數型別感染。

討論

1. LJ自ITT陽性動物分離*M. bovis*之比率為40.9%，比例仍偏低；另外動物若有病灶，分離率可達87.5%；有病灶之牛隻的其他部位檢體(無病灶之淋巴結或肺臟等)仍有少數可分到病原(8%)。MGIT™檢驗陽性率雖高為66.2%，重複測試下僅2件LJ分離陰性之檢體確定為陽性，其他20件檢體(39.2%)可能為環境性分枝桿菌或汙染菌影響所致，較傳統分離節省時間，分離率稍高但特异性偏低。
2. 依照Spoligotypes資料庫上牛型分枝桿菌型別與分布，台灣流行比例最高之SB0265型，主要流行於法、德、加拿大等。SB1040型主要流行於南美洲巴西、墨西哥等。SB0140型主要流行於英國等歐洲國家(圖1)。台灣與上述國家皆已多年沒有草食動物買賣，故推測菌株應是更早之前進入台灣。
3. SB0265型在台一直為主要流行菌株，分布於全國；SB1040型本只限於嘉義，今年卻於新竹出現；SB0140往年出現於雲嘉屏，但於屏東已消失三年，今年於屏東吳姓牧場出現，該場2012年感染菌株SB0265型且已清淨，故確定今年為新感染，原因需再進行流行病學分析(圖2)。
4. 2013年10月底中部屠宰場連續檢出4例疑似病例，分離結果確定為陽性後回溯陽性牛場(皆為淘汰母牛)，分離出3種不同型別，表示屠宰場檢查系統極為重要，同時顯示肉牛場之管理甚為重要(圖3)。
5. 今年高密度陽性場區有兩個，分別在A區4場與B區3場，A區內陽性場相距不超過1公里，B區內陽性場相距5-8公里。相似處為兩個陽性區皆同時具有SB0265與SB0140兩個型別，顯示兩區傳染源應都不只一個(圖4)。

6. 數場陽性場為新感染且來源不明，高密度陽性場區有兩種以上型別流行且感染源亦不明，以及屠宰場淘汰乳牛可檢出之多種型別，皆指出可能有不少未檢出之陽性場潛伏形成傳染源。原因不外乎檢驗人員未正確操作與判定，或畜主有心逃避檢驗。

結論

有結節病灶之動物未能完全分離到病原顯示分離操作上應有進步空間，再者病灶之型態與嚴重程

度也有必要記錄以便日後分析。而現場檢驗方面，人員操作之操作能力、如何正確施打藥劑及判讀極為重要；另外應建立畜主防疫觀念，對疑似染病動物隱匿、買賣或私用藥物治療，不但觸法還可能造成人或其他動物之危害。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會104年度科技計畫「反芻動物牛型分枝桿菌流行病學分析」(計畫編號：104農科-10.1.1-衛-H7)補助，謹此致謝。

表1、2014年台灣ITT陽性牛隻牛型分枝桿菌分離LJ與MGIT™分離法統計。

	檢驗數量	分離陽性數 (%)	說明
送檢場次	20	12 (60)	
送檢牛隻(頭)(LJ)	44	18 (40.9)	
送檢牛隻(件)(MGIT)	44	18 (40.9)	
總檢體數(頭)(LJ)	77	29 (37.7)	
總檢體數(件)(MGIT)	77	31 (40.3)	
有病灶之動物(頭)	16	14 (87.5)	ITT 陽性動物有病灶比例 36.4%(16/44)
有病灶之檢體(件)	27	25 (92.6)	1. 27 件檢體皆來自前項 16 頭動物。 2. 合計 LJ 與 MGIT™ 分離 法，分離陽性之檢體中 病灶率為 80.6% (25/31)。

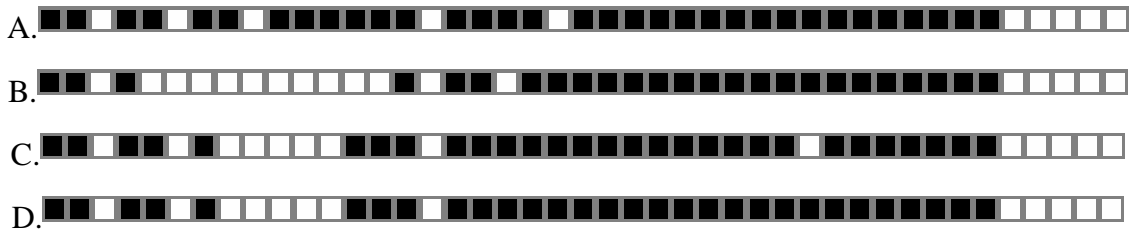


圖1、Spoligotypes型別與分布，A：SB0265型，主要流行於法、德、加拿大等。B：SB1040型，主要流行於南美洲巴西、墨西哥等。C：SB1182型，資料庫中僅一筆資料來自北愛爾蘭；此型別於本研究中並未出現。D：SB0140型，主要流行於英國等歐洲國家。

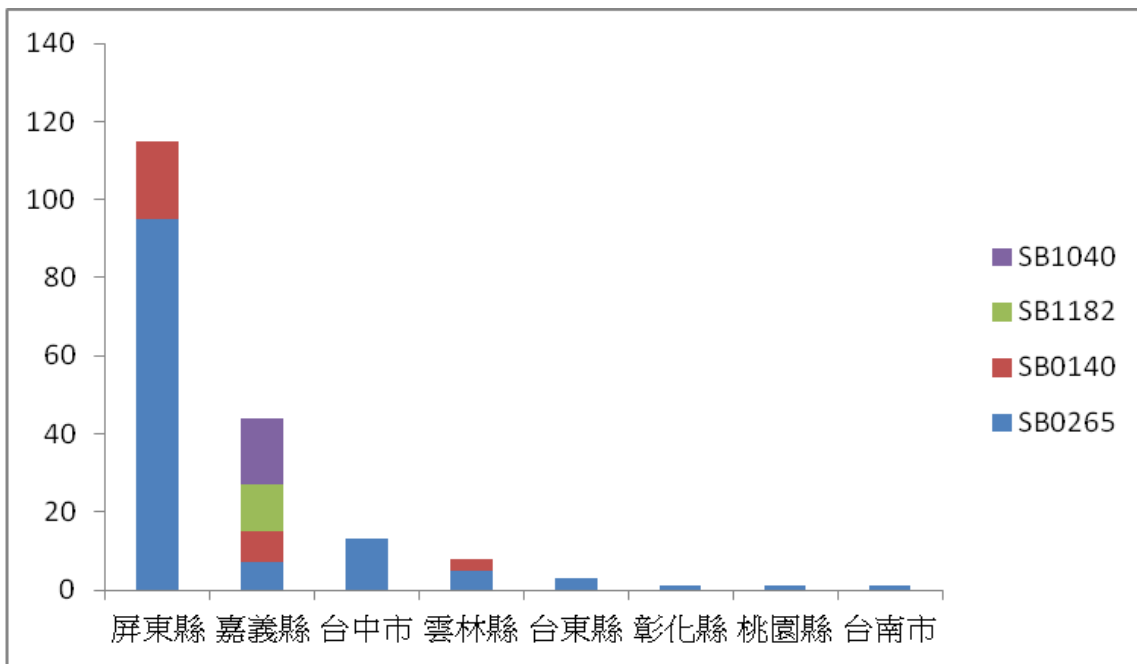


圖2、1997-2013年spoligotypes分布 (X軸縣市，Y軸菌株數量)。

2014 年台灣牛型分枝桿菌基因型分析

型別(新竹)	分離菌株數/場次
SB0265	3/1
SB1040	2/1
型別(台中)	分離菌株數/場次
SB0265	2/1
型別(彰化)	分離菌株數/場次
SB0265	3/1
型別(雲林)	分離菌株數/場次
SB0265	5/2
SB0140	3/2
型別(嘉義)	分離菌株數/場次
SB0140	2/1
型別(屏東)	分離菌株數/場次
SB0265	6/2
SB0140	5/1



圖3、2014年31株*M. bovis*從12場次分離而得，特別標示處為屠宰場回溯之4場。臺灣地圖來源：Google。

型別(新竹)	分離菌株數/場次
SB0265	3/1
SB1040	2/1
型別(台中)	分離菌株數/場次
SB0265	2/1
型別(彰化)	分離菌株數/場次
SB0265	3/1
型別(雲林)	分離菌株數/場次
SB0265	5/2
SB0140	3/2
型別(嘉義)	分離菌株數/場次
SB0140	2/1
型別(屏東)	分離菌株數/場次
SB0265	6/2
SB0140	5/1

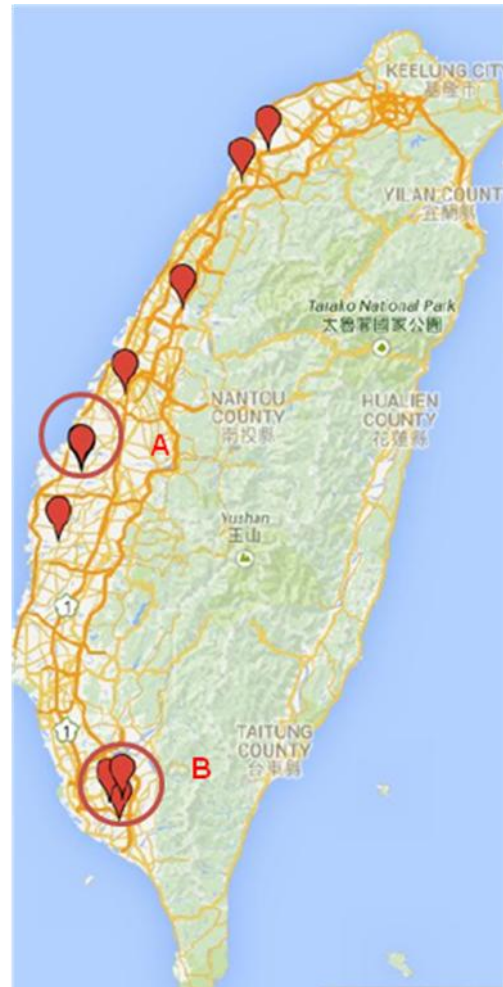


圖4、高密度陽性場區位置，分別在A區4場與B區3場，A區陽性場相距不超過1公里，B區陽性場相距5-8公里。臺灣地圖來源：Google。

參考文獻

1. 王振練。以間隔寡核苷酸型別法偵測乳牛周邊血液之牛分枝桿菌。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。1999。
2. 衛生福利部疾病管制署。傳染病標準檢驗方法手冊(上)。2014。
3. Hauer A, De Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, Bulach T, Bañuls AL, Biet F, Boschirolu ML. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. PLoS One 6:10(2) 2015.
4. Jou R, Huang WL, Chiang CY. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, Taiwan. Emerg Infect Dis 14:515-517, 2008.
5. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol 40:153-177, 1994.
6. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Ch2.4.7, 2009.
7. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis 76 Suppl 1:1-46, 1995.
8. Smith NH, Dale J, Inwald J, Palmer S, Gordon SV, Hewinson RG, Smith JM. The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. Proc Natl Acad Sci U S A 100:15271-15275, 2003.

The genotypes study of *Mycobacterium bovis* in 2014 Taiwan

CS Huang^{*}, C Tu, HJ Tsai

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract From October, 2013 to October, 2014, 31 *Mycobacterium bovis* samples were isolated from 44 intradermal tuberculin test (ITT) positive cattle (positive rate 40.9%, 18/44). In these cattle, the rate of nodule development and nodular animals with positive culture were 36.4% (16/44) and 87.5% (14/16), respectively. The spoligotypes of 31 *M. bovis* isolates were identified as SB0265 (61.3%) in 19 isolates, SB0140 (32.3%) in 10, and SB1040 (6.5%) in the case of two isolates. SB0265 was the most prevalent strain in Taiwan. SB0140 was found only in Chiayi and Hsinchu. SB0140 was isolated in Yunlin, Chiayi, and Pingtung. SB0140 disappeared from Pingtung for a 3 year period, but was uncovered in this province this year. The clusters of bovine TB positive herds appeared in 2 areas, the herds in A area were close to each other (<1km) and the herds in B area were at a distance of 5-8 km from one another. Both A and B groups have herds infected with both SB0265 and SB0140, indicating more than one infection source.

Keywords: *Mycobacterium bovis* ; bovine tuberculosis ; genotyping

