

乳牛及鹿分離之牛分枝桿菌及其基因分型

蔡洵洵、黃春申、官南綾、黃子鳴、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 本所 2008 年至 2011 年接受 475 頭結核菌素試驗陽性乳牛；2009 年至 2010 年接受 77 隻結核菌素試驗陽性鹿隻，進行分枝桿菌分離鑑定，結果 *Mycobacterium bovis* 分離率在乳牛和鹿隻分別為 18.3% (87/475) 和 50.6% (39/77)，兩者呈現顯著差異 ($P < 0.05$)。1997 年至 2007 年共收集 24 株牛源 *M. bovis*，此期間結核菌素陽性牛總數資料因不完整而未將此 24 個菌株列入前述之分離率計算。分析 1997 年至 2011 年所收集的 111 株 (24 株來自 1997 年至 2007 年；87 株來自 2008 年至 2011 年) 牛源 *M. bovis* 地理分布，發現菌株主要分布於 3 個縣市，依次為屏東縣 75 株 (76.5%)、雲林縣 18 株 (18.4%) 及嘉義縣 11 株 (11.2%)，其餘則分散於台東縣 (3 株)、桃園縣 (1 株)、台中縣 (1 株)、彰化縣 (1 株) 和台南縣 (1 株)。進一步將分離株以間隔寡核苷酸分型法 (spoligotyping) 進行基因型分析，並與國際資料庫 (<http://www.mbovis.org>) 進行比對，顯示台灣地區牛隻之主要流行菌株為 SB0265 (72.1%) 與 SB0140 (25.2%)，其餘為 SB1040 (1.8%) 和 SB1182 (0.9%)；鹿隻則為 SB0265 (97.4%) 和 SB0140 (2.6%)。以上結果顯示結核菌素陽性鹿隻之 *M. bovis* 分離率顯著 ($P < 0.05$) 高於牛隻，且牛與鹿有共通基因型別。

關鍵詞：牛分枝桿菌、間隔寡核苷酸分型法、結核菌素試驗、乳牛、鹿

緒言

牛分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*) 為人畜共通性病原，革蘭氏陽性抗酸性桿菌，絕對好氧細菌，細胞壁富含脂肪及 Mycolic acid，生長最佳溫度為 37-38°C，經 6-8 週或更久始可見菌落。牛為其自然宿主，感染後會產生肉芽腫性、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，也可能形成厚壁包膜包覆濃汁及鈣化中心，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、食入或經由胎盤或傷口感染，吸入為主要之傳播途徑，而經由胎盤或

傷口的感染案例極少 [1,15]，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，也多是經由咳嗽等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。屠宰場及牧場人員也偶見肺部病灶 [14]。野生動物的牛型分枝桿菌感染報告首先於 1929 年在南非的羚羊發表，而在 1940 年代同區域的大羚羊有地區性流行，之後本病陸續在世界各地各種野生動物身上發現例如野牛、山羊、馬、駱駝、豬、野豬、鹿、各種羚羊、獾、雪貂及靈長類等 [1,3,12]。

在國際上，具有牛結核病撲滅計畫的國家，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。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，在進一步研究上，發現某些野生動物宿主會保存病原，變成感染的來源，而傳染給牛、鹿及其他牧場動物[2,5]。

牛分枝桿菌的基因分型目前在國際上已發展出如限制性長度多型性分析（RFLP）、變異性重複序列（VNTR）和間隔寡核苷酸分型法（spoligotyping）等多種分型技術，而其中spoligotyping是目前各國於大規模的菌株基因分型上使用頻率較高和結果相對較穩定的一種分型方式，一個好的基因分型方法必須具有在同一菌株間穩定性高而在同一物種間變異性大的特質，如此才有助於流行病學的調查，而spoligotyping正是符合此種特質的分型方法；在國外關於以spoligotyping進行分型的研究上，2012年於南美洲五個國家進行的一項大規模調查顯示，在牛隻流行的菌株以SBO140為主，此型被認為是歐洲常見的型別之一，特別是在英國和其他和英國曾有牛隻貿易的國家[17]。中國關於*M. bovis*的基因分型研究於2007至2008年收集六場共1067頭皮內結核菌素陽性牛隻由喉頭培養而來的結核菌性分枝桿菌共43株，分離率4%（43/1067），43株中分出26種spoligotypes，包括常見於感染人的北京株族群[7]；而在中國第二大養牛區域的新疆地區以406隻結核菌素駢比試驗陽性牛隻為對象，共分離出135株*M. bovis*，分離率33%（135/406），共4種spoligotypes，而SBO140為其中一種型別[16]。

台灣自民國1956年起針對乳牛以結核菌素皮內試驗進行檢測，陽性牛隻一率採取撲殺的策略，但直至目前台灣仍未完全清除本病。前人關於結核菌素陽性牛的研究中，2002年葉等人於72隻結核菌素陽性牛分離出49株*M. bovis*，分離率為68.1%[2]。參考國外研究發現以基因分型調查和追蹤牛結核病流行病學已成為一不可或缺的方法，因此本研究希望藉由細菌的基因型分析和地域資料探究此菌於台灣的流行病學，希望藉此提供相關單位有效控制本病蔓延的防治對策。

材料與方法

材料來源

收集的材料來源為1997年至2011年結核菌素陽性乳牛剖檢的組織病材，主要為肺臟或淋巴結，病材來源的縣市包括桃園縣、雲林縣、台中縣、彰化縣、嘉義縣、台南縣、屏東縣與台東縣等。鹿隻來源為民間飼養繁殖之水鹿，縣市來源無資料。

病原分離

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（gentle MACS 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（gentle MACS™ 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3000 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LJM-w/o-G，放入含5% CO₂的37°C培養箱培養。

LJM持續觀察14週，若出現白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LJM的菌落以商品化之spoligotyping kit進行*M. bovis*鑑定。

皮內結核菌素檢驗法

診斷液源於牛型結核菌（Strain AN5）之結核菌素（Purified Protein Derivatives；PPD），其濃度為每毫升3毫克（3mg/ml）。將結核菌素注射劑量每頭0.1毫升注入尾根皺襞，判定標準為牛隻應於注射後七十二小時（前後六小時內），同時以視診及觸診來進行檢查。牛隻注射部位出現任何腫脹均為陽性反應。腫脹可能有硬結並隱約可見界限，或可能為柔軟而瀰漫性之腫脹。呈陽性反應之牛隻即判定為罹患結核病之牛隻。

間隔寡核苷酸分型法 (Spoligotyping)

針對結核型分枝桿菌群中重複片段區域 (direct repeat, DR) 設計之市售套組，可有效區分人型及牛型分枝桿菌，並且可同時對菌株進行基因分型，方法如下：使用商品化的PCR預混小管 (Ready-to-use PCR beads, GE)，設置陽性與陰性對照組，陰性對照組添加20 μ l水，引子DRa、DRb各2.5 μ l，其餘管內添加17 μ l水後，依序加入引子DRa、DRb各2.5 μ l，最後加入檢體3 μ l。執行PCR程式為95°C 作用5分鐘，再以 95°C作用1分鐘、55°C作用1分鐘、72°C作用30秒共進行30個循環，最後72°C作用5分鐘。產物以商業化的spoligotyping kit (Isogen, Life Science, The Netherlands) 進行雜合反應，操作步驟如下：將產物20 μ l加入150 μ l的2倍SSPE/0.1% SDS，99°C作用10分鐘後置於冰上備用，將套組內的雜交膜以2倍SSPE/0.1% SDS 250 ml 於60°C振盪器沖洗5分鐘，將膜固定於miniblotter後將產物注入每一個孔洞中，於60°C雜交箱中靜置60分鐘，取出miniblotter內的雜交膜以2倍SSPE/0.5% SDS 250 ml 於60°C震盪器沖洗5分鐘，重複清洗2次，將膜置入雜交專用的滾瓶中並加入內含2.5 μ l streptavidin-peroxidase conjugate (500U/ml) 的2倍SSPE/0.5% SDS 10 ml，於42°C雜交箱中滾動作用60分鐘，取出雜交膜以2倍SSPE/0.5% SDS 250 ml 於42°C振盪器沖洗10分鐘，重複清洗2次後於室溫下置於250 ml的2倍SSPE中5分鐘，以20 ml的ECL於膜上作用1分鐘後以底片進行感光，最後以底片上43個重複片段區域之間的核酸訊號之有無來區分結核分枝桿菌群。

結果

2008年至2011年接受475隻結核菌素試驗陽性牛隻進行分枝桿菌分離鑑定，共87個病例分離出 *Mycobacterium bovis*，分離率為18.3%；2009年至2010年接受77隻結核菌素試驗陽性鹿隻進行分枝桿菌分離檢驗，於39個病例分離出 *M. bovis*，分離率為50.6% (表1)。1997年至2011年所收集的111株牛來源之 *M. bovis* 主要分布於3個縣市，依

次為屏東縣75株 (76.5%)、雲林縣18株 (18.4%) 及嘉義縣11株 (11.2%)，其餘則分散於台東縣 (3株)、桃園縣 (1株)、台中縣 (1株)、彰化縣 (1株) 和台南縣 (1株) (圖1)。鹿隻來源菌株無法得知分離縣市。分離株以間隔寡核苷酸分型法 (spoligotyping) 進行基因型分析，並將結果和國際資料庫 (<http://www.mbovis.org>) 進行比對，顯示台灣地區牛隻間主要流行菌株為SB0265 (72.1%，80/111) 與SB0140 (25.2%，28/111)，其餘為SB1182 (0.9%，1/111) 和SB1040 (1.8%，2/111)；鹿隻則為SB0265 (97.4%，38/39)、SB0140 (2.6%，1/39) (圖2)。SB0265基因型在各縣市皆有分離出，SB0140基因型出現於屏東縣、雲林縣與嘉義縣，SB1182 和SB1040基因型僅出現於嘉義縣 (圖3)。39株來自鹿隻的 *M. bovis* 型別以SB0265為主 (97.4%)，而SB0140僅有1株 (2.6%) (圖2)。

討論

自2008年至2011年進行的牛隻分枝桿菌分離檢驗分離率為18.3%，鹿隻分離率為50.6%，牛隻分離率顯著較鹿隻為低 ($P < 0.05$)，推測其原因可能與牛結核病在病灶通常呈現寡菌性狀態，容易因組織內無足夠的病原存在而使培養失敗，而鹿之病灶內所含菌量都相對多於牛隻[12]。乳牛結核病自民國1954年以來開始實施皮內結核菌素試驗 (intradermal tuberculin test; ITT) 之陽性牛撲殺政策至今，因每年定期檢測並淘汰陽性牛，因此新檢出的牛隻多為無症狀之初期感染者，而於鹿隻並無法令強制進行例行性的皮內結核菌素試驗，故鹿隻往往於病程發展後期，呈現臨床症狀後畜主才予以送檢，推測以上這些因素可能是導致實驗室牛隻分離率低於鹿隻的原因。

分析1997年至2011年所收集的111株牛來源之 *M. bovis*，主要分布於全國3個縣市，其餘分散於台東縣 (3株)、桃園縣 (1株)、台中縣 (1株)、彰化縣 (1株) 和台南縣 (1株)，且2008年至2011年間除了屏東縣、雲林縣和嘉義縣有牛結核病陽性場

之外，其餘5個縣市只有台東縣曾出現過一場陽性場，表示政府的乳牛結核病防治政策針對移動管制的部分有一定的成效，但其餘3個發生率高的縣市至今仍偶可檢出陽性牛隻，前人的研究顯示，牛型結核菌於低溫潮濕的土壤中可存活最長達88日[4,7]，另葉等人以針對*M. bovis*特定基因進行牛隻血液的PCR反應，發現陽性場的牛隻其場內ITT陰性牛約有7.9%為陽性，推測陽性場畜舍環境或牧場未被檢出的帶原牛隻可能是造成陽性場無法有效清除的原因[2]。

111株*M. bovis*分離株以間隔寡核苷酸分型法（spoligotyping）進行基因型分析，結果和國際資料庫（<http://www.mbovis.org>）進行比對，顯示台灣地區流行的菌株主要為SBO265 和SBO140，其中SBO265根據文獻顯示其亦流行於法國、德國和美國等國家，SBO140則為英國的最大族群菌株[8,11]，推測此兩型菌株可能是早期隨國際貿易而進入本土，因分枝桿菌被認為是演化緩慢的菌種，又根據其他學者提出的族群擴張（clonal expansion）理論，推測此兩型菌株不一定是最早傳入本國的菌株，但可能為進入本土牛群中而逐漸適應為具族群優勢的基因型[16]，值得注意的是根據行政院衛生署疾病管制局發表的研究顯示於2004至2005年國內共有15例人類感染*M. bovis*的病例且分離出的基因型皆為SBO265 [9]。SB1182 和SB1040基因型分別於2010年和2011年分離出且僅分別出現於嘉義縣的特定牧場中，且這些陽性場中亦同時存在SBO265基因型，推測SB1182 和SB1040可能為新引入國內的基因型，亦有可能為SBO265基因型演化而來，可再進行其他基因型別分析方法以釐清問題。

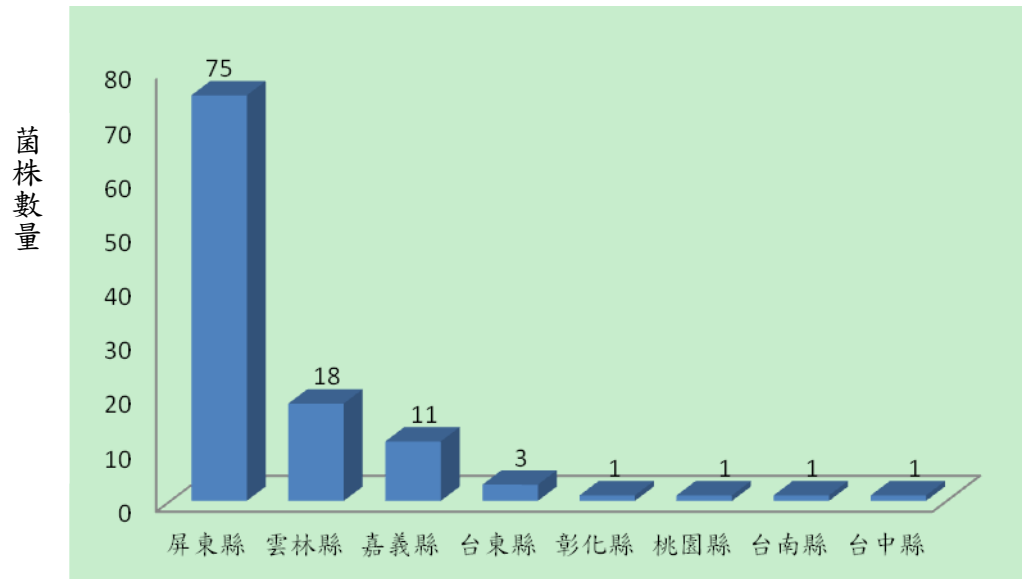
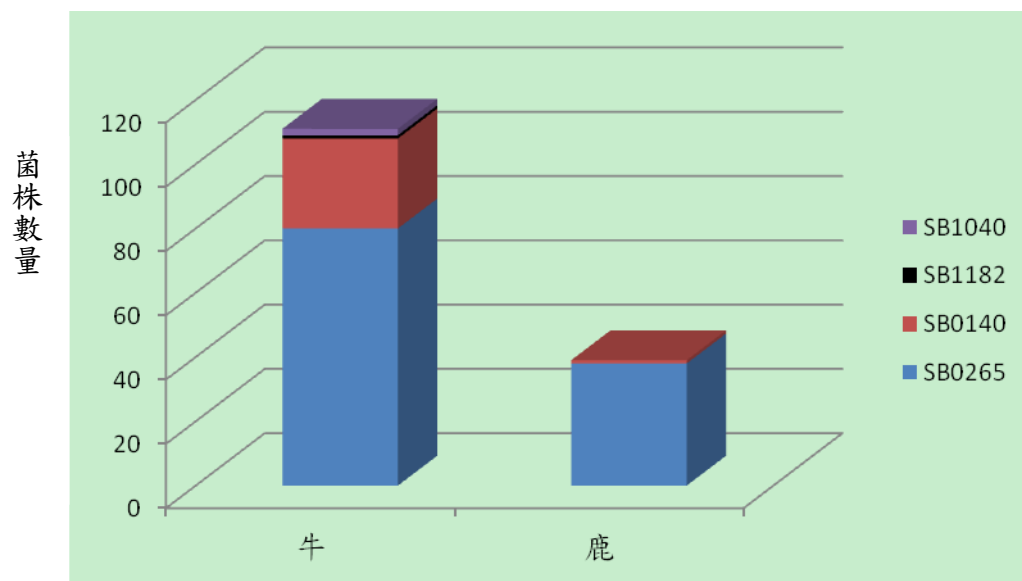
目前國內鹿隻並無實行強制的結核菌素試驗，本研究顯示本土鹿隻流行的型別主為SBO265，與乳牛流行之主要型別相同，顯示疾病於兩物種間仍有互相

傳播的可能，但國內素來牛與鹿分開飼養，且兩者飼養場通常不會在同一地區之鄰近，而牛鹿飼養者通常不同且鮮少往來。另方面台灣地區鹿隻結核病以水鹿為主，而水鹿早期捕獲自野外山林，因此若由結核病之傳染途徑主由飛沫呼吸道而消化道相對少來推測，鹿之結核病菌株型別雖然與乳牛相同，但兩者間藉由直接接觸傳染之機率極為稀少，是否為早期經由特殊途徑傳染則有待進一步研究。

於各年度*M. bovis*分離率比較，牛於2008年至2010年的分離率為15.9%（68/429），2011年為41.3%（19/46），兩者有顯著差異（ $P < 0.05$ ）；鹿於2009年至2010年的分離率為44.6%（29/65），2011年為83.3%（10/12），兩者有顯著差異（ $P < 0.05$ ），推測牛隻的分離率於2011年提高的原因推測為病材處理時均質機的改良使組織能均質化卻又不使分枝桿菌死亡，又培養的去污液由傳統的酸鹼中和法改良為醫院痰液培養的NALC-NAOH去污液，減少過程中分枝桿菌的死亡而使分離率增加；在鹿隻於2011年分離率顯著提高的原因除培養方法的改良外亦可能為當年度病材數量過少使樣本過小之故。

在防疫觀點上台灣地區牛隻來源的*M. bovis*目前只分出4種spoligotype，且第一和第二大族群就占了所有分離株的97%，推測台灣地區牛結核病持續發生的主因可能因接觸陽性場間散播的菌株而不是感染隨國際貿易進入的外來菌株，導致分離出的菌株基因型種類偏少，而這也表示未來國內畜牧場應加強防治措施包括確實檢出陽性牛和宣導畜主消毒環境以杜絕感染源，值得注意的是鹿隻也會感染和牛隻同樣型別的菌株，建議將鹿隻的檢疫列為疾病防堵的重點之一，才能收整體防疫之功效。

乳牛及鹿分離之牛分枝桿菌及其基因分型

圖 1、1997 年至 2011 年牛來源 *M. bovis* 之分布情形。圖 2、1997 年至 2011 年牛隻與 2009 年至 2010 年鹿隻來源的 *M. bovis* 之 spoligotype 分布結果。

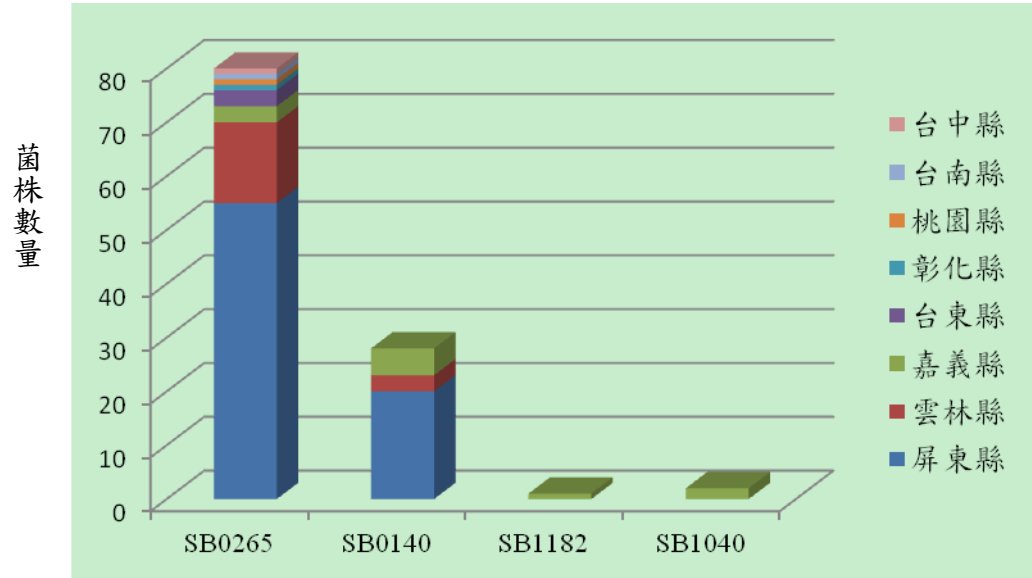


圖 3、1997 年至 2011 年牛來源 *M. bovis* 的 spoligotype 於各縣市分布情形。

表 1、2008 年至 2011 年 ITT 陽性牛隻與鹿隻的分離數與分離率。

	2008 年	2009 年	2010 年	2011 年	總計
ITT 陽性牛隻數	30	169	230	46	475
<i>M. bovis</i> 分離陽性數	4	32	32	19	87
分離率 (%)	13. 3	18. 9	13. 9	41. 3	18. 3
ITT 陽性鹿隻數	0	43	22	12	77
<i>M. bovis</i> 分離陽性數	0	18	11	10	39
分離率 (%)		41. 9	50	83. 3	50. 6

致謝

本研究承蒙台灣大學獸醫系、中興大學獸醫系、嘉義大學獸醫系、屏東科技大學獸醫系及屏東縣家畜疾病防治所提供結核菌素試驗陽性動物剖檢之病材及協助，謹併誌萬分謝忱。

參考文獻

1. 吳惠惠。牛病學。藝軒，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 RG, Kriek NP, Keet DF, Raath JP, deVos V, and Huchzermeyer HF. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer-sparman*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort J Vet Res.* 63(1):15-18, 1996.
4. Corner LA. 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 GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech.* 20(1):86-111, 2001.
6. Du Y, Qi Y, Yu L, Lin J, Liu S, Ni H, Pang H, Liu H, Si W, Zhao H, Wang C: Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolated from cattle in northeast and northwest China. *Res Vet Sci* 90: 385-391, 2010.
7. Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int.* 2011:765430, 2011.
8. Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J Clin Microbiol.* 39(10):3623-3632, 2001.
9. Jou R, Huang WL, Chiang CY. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 14(3):515-517, 2008.
10. Mackintosh CG, de Lisle GW, Collins DM, Griffin JF: *Mycobacterial diseases of deer.* *N Z Vet J* 52: 163-174, 2004.
11. Milian-Suazo F, Harris B, Arriaga Diaz C, Romero Torres C, Stuber T, Alvarez Ojeda G, Morales Loredó 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.
12. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol.* 40(1-2):153-177, 1994.
13. Sun Z, Cao R, Tian M, Zhang X, Li Y, Xu Y, Fan W, Huang B, Li C: Evaluation of Spoligotyping and MIRU-VNTR for *Mycobacterium bovis* in Xinjiang, China. *Res Vet Sci* 92: 236-239, 2011.
14. OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2011. Ch 2.4.7, 2011.
15. 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.
16. 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(25):15271-15275, 2003.
17. Zumarraga MJ, Arriaga C, Barandiaran S, Cobos-Marin L, de Waard J, Estrada-Garcia I, Figueiredo T, Figueroa A, Gimenez F, Gomes HM, Gonzalez YMJA, Macias A, Milian-Suazo F, Rodriguez CA, Santillan MA, Suffys PN, Trangoni MD, Zarraga AM, Cataldi A: Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. *Res Vet Sci,* AUG.7, 2012.

Genotyping of *Mycobacterium bovis* Isolated from Cow and Deer in Taiwan

HH Tsai, CS Huang, NN Kuan, TM Huang, and C Tu

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract A total of 87 *Mycobacterium bovis* isolates from 475 intradermal tuberculin test (ITT)-positive cows during 2008 to 2011, and 39 *M. bovis* isolates from 77 ITT-positive deer from 2009 to 2010, were collected in the present study. The isolation rate of *M. bovis* in deer was significantly higher (50.6%, 39/77) than in cow (18.3%, 87/475). During 1997-2007, 24 isolates have been obtained without known from how many ITT positive cows. The distribution of 111 *M. bovis* isolates collected from cow during 1997 to 2011 revealed that 75 isolates in Pingtung County (76.5%), 18 in Yunlin County (18.4%), 11 in Chiayi County (11.2%), 3 in Taitung County (2.7%) , 1 in Taoyuan, Taichung, Changhua, and Tainan County (0.9%), respectively. Four patterns were identified among the 111 bovine isolates using a spacer oligonucleotide typing (spoligotyping) method compared with four patterns observed in the *M. bovis* molecular typing database (<http://www.mbovis.org>). Pattern SB0265 was the dominant spoligotype (72.1% of the isolates), followed by SB0140 (25.2%), SB1182 (0.9%), and SB1040 (1.8%) respectively. Only two patterns of spoligotyping were identified from deer isolates (SB0265, 97.4% and SB0140, 2.6%, respectively). In general, this study demonstrated the isolation rate of *M. bovis* in deer was significantly higher than in cow ($P<0.05$), and SB0265 was the most common spoligotyping pattern isolates from both cow and deer in Taiwan.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, intradermal tuberculin test, cow, deer