

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000209

衛生福利部疾病管制署 103 年署內科技研究計畫

計畫名稱：開發簡易牛型結核病的快速檢測試劑及方法

103 年 度 全 程 研 究 報 告

執行單位：衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：黃偉倫

計畫協同主持人：周如文

研究人員：陳沅勝

執行期間：103 年 01 月 01 日至 103 年 12 月 15 日

目 錄

目 錄	2
中英文摘要	4
本 文	6
前言	6
材料與方法	10
一、材料	10
二、實驗方法	10
結果	15
一、三色螢光即時聚合酶連鎖反應(triplex real-time polymerase chain reaction)的建立	15
二、牛型結核菌(<i>M. bovis</i>)的實驗室監測	16
討論	20
一、三色螢光 real-time PCR 檢測法	20
二、 <i>M. bovis</i> 檢出比例及地區	21
三、潛在的感染族群及未知的感染途徑	22
四、臨床監測的應用	22
重要研究成果及具體建議	24
參考文獻	25

圖、表	29
圖一、三色螢光 real-time PCR 鑑別不同 MTBC 菌種	29
圖二、三色螢光 real-time PCR 的偵測極限	30
圖三、部彰醫院個案地域分析	31
表一、標準菌株測試三色螢光 real-time PCR 結果	33
表二、三色螢光 real-time PCR 結果判定說明	34
表三、2014 年送驗 MTBC 菌株經三色螢光 real-time PCR 之 菌種鑑定結果	35
表四、三色螢光 real-time PCR 檢出 <i>M. bovis</i> 陽性個案分析	36
附 錄	37

中英文摘要

中文摘要

牛型結核菌(*Mycobacterium bovis*)為重要的人畜共通傳染病原之一，傳播途徑主要藉由飲用未經滅菌完全的乳製品、未煮熟的肉品等及密切接觸已遭牛型結核菌感染的動物。雖然農委會已經建立我國牛隻牛型結核菌的監測系統，但是目前仍未有人遭牛型結核菌感染致病的檢驗及監測系統。在先前研究中，於 2010 至 2012 年間，7 例通報人結核病個案被實驗室檢測確認為由牛型結核菌感染所致，其中 5 例與養鹿產業有緊密關聯性。本研究開發一項簡單且快速的三色螢光即時定量聚合酶連鎖反應方法，可同時鑑別 *M. bovis*, *M. bovis*-BCG 及其它結核菌群。此方法學已以 72 株分枝桿菌參考菌株評估確認外，並同時與市售 2 項商品試劑 spoligotyping 及 GenoType MTBC 相較，測試 40 株臨床結核菌群後，發現方法學間檢定結果並無任何不一致。本計畫另一目的為建立高風險牛型結核菌感染區域的實驗室監測系統，計畫執行期間尚無發現任一例符合實驗組的個案，但是在 625 例結核病確診個案對照組中，使用所發明的三色螢光即時聚合酶連鎖反應法，共鑑別出 14 例 *M. bovis* 陽性個案，但是卻均無養鹿畜產的接觸史。未來的研究，應優先強化監測系統，進行所有可能造成感染途徑的疑似個案鑑別診斷，而非只侷限具養鹿接觸史。

關鍵字：牛型結核菌、菌種診斷、人畜共通傳染病

英文摘要

Mycobacterium bovis is one of the causative agents of tuberculosis (TB) in humans and animals. Drinking unpasteurized milk, eating undercooked meat, and close contact with infected animals are the main sources of infection for humans. Although an *M. bovis* surveillance program for farm animals has been implemented by the Taiwan Council of Agriculture, no surveillance system exists for human TB cases caused by *M. bovis*. In previous study, 7 human TB cases were identified to be infected by *M. bovis* between 2010 and June, 2012. Of the 7 cases, 5 cases had close contact history with deer. We developed a simple and rapid triplex real-time PCR that using three fluorescence probes for differential identification of *M. bovis*, *M. bovis* BCG and other MTBC at the same time. We evaluated the real-time PCR with 72 reference isolates with various *Mycobacterium* species.. The real-time PCR was also compared to 2 commercial methods including spoligotyping and the GenoType MTBC kit. No discordant result was observed after testing 40 clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. The other purpose of this study is to set up a laboratory-based surveillance system in the high-risk area in Taiwan. In study period, no experimental case was found in the central Taiwan. However, of the 625 control cases, we identified 14 *M. bovis* cases with no contact history with deer using the triple real time PCR. A strengthened surveillance system for any suspected cases other than those having close contact with deer is recommended.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, species diagnosis, zoonosis

本 文

前言

牛型結核菌(*Mycobacterium bovis*)會導致人畜共通的結核病，主要的帶原宿主為牛及其他畜產動物（如綿羊、山羊、鹿等）或其他野生動物¹，其先天對 Pyrazinamide (PZA)具有抗藥性。全球主要的動物結核病絕大部分是由 *M. bovis* 造成，病灶為產生肉芽腫結節，乾酪樣結節及鈣化，主要位於頭胸部淋巴結或腸系膜淋巴結，也可能形成厚壁包膜包覆膿汁及鈣化中心，牛型結核病在世界各國造成嚴重之經濟損失，其病原體會經由空氣及未殺菌完全的畜產品（如未經巴斯德滅菌的乳製品或生食肉品或生飲血液等）進行人畜間傳播²，人類的感染主要經由與感染的畜產動物密切接觸或食用未殺菌完全之生乳，因此屠宰場及牧場人員為遭 *M. bovis* 感染高危險群³。*M. bovis* 屬於結核菌群(*M. tuberculosis* complex, MTBC)，此類菌群除了已知造成人類嚴重疾病的 *M. tuberculosis* 外，*M. caprae* 被認為是山羊結核病主要病原⁴，*M. caprae* 也是中歐某些國家牛結核病主要病原，*M. pinnipedii* 主要感染海豹與海獅等海洋哺乳動物⁵。在國際上，皮內結核菌素測試 (tuberculin skin test, TST) 被認為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，常被發現並不具有臨床結核病特徵。以嚴格之結核菌素試驗篩檢並且撲殺陽性牛隻，在部分國家的確達到清除本病的目的，但是這策略在其他國家並不成功。在進一步研究上，發現某些野生動物會保存病原，變成感染的來源宿主，而傳染給牛、鹿及其他牧場動物⁶。

過去 20 年來，全世界針對人畜共通的 *M. bovis* 導致人類感染結核病的研究報告並不普遍，西方各國未引入巴斯德滅菌法前，因食用生乳導致結核病具明顯的比例。之所以無法快速區分牛型結核菌與人

結核菌，部分原因在於缺乏快速有效的診斷工具。至於 *M. bovis* 在全球的流行病學資料，2013 年 Borna Muller 等人的研究針對至 2010 年 3 月止，所有有效篩選共 1203 篇文獻，統計分析全球 5 大區域（非洲、美洲、歐洲、東地中海區及西太平洋區）的人感染牛型結核病的資料⁷，非洲地區人感染 *M. bovis* 約占該區所有結核病的 2.8%，最嚴重的 3 個國家，衣索比亞、奈及利亞及坦尚尼亞，*M. bovis* 約占該國所有人結核病的 17%、15.4% 及 26.1%⁸⁻¹¹；美洲地區人感染 *M. bovis* 約占該區所有人結核病的 0.3%，墨西哥為該區最嚴重的區域，*M. bovis* 約占該國所有人結核病的 7.6%¹²⁻¹⁴。在美國人感染牛型結核病經調查與西班牙裔社區有關¹⁵，特別是來自墨西哥，經由公衛端與實驗室的證據顯示，食用未經巴斯德滅菌遭污染的起司製品為主要原因¹⁶⁻¹⁹。歐洲感染 *M. bovis* 約占該區所有人結核病的 0.4%，西班牙甚至發生 2 起多重抗藥 *M. bovis* 造成的院內感染²⁰。東地中海區域僅有 2 篇研究，分別是埃及的 2.2% 與東非吉布地的 0.6%。西太平洋區僅澳洲、紐西蘭及中國某部分有數據，分別為 0.2%、2.7% 及 0.2%。

我國自 1956 年起即建立動物結核病的監測系統，強制對於牛及羊以結核菌素皮內試驗進行檢測，陽性結果的動物一律採取撲殺的策略²¹，2005 年農委會針對 111,412 頭牛及 73,396 頭羊進行結核菌素檢測，分別發現 188(0.17%) 及 148(0.2%) 件陽性反應。與前述牛羊強制進行結核菌素皮內試驗相較，於易受驚嚇的鹿隻防疫管理，則採取志願性質，非強迫性，由畜產業者主動申請檢測。1987-1991 年農委會家畜防治所曾進行鹿隻結核菌素測試陽性率達 3-7.9%。2011 年動植物防疫檢疫局年報指出 2010 共完成 93520 隻乳牛，50641 隻乳羊及 8815 隻鹿之結核菌素測試，但檢驗陽性數未提及。若依 2012 年第三季全國鹿場及數目資料粗略估計，全國飼養鹿隻進行結核菌素檢測應

未達 40%。

2004-2005 年間，疾病管制局研究檢驗中心分枝桿菌實驗室(以下簡稱本實驗室)針對例行保存結核菌株進行分析，於 3,321 株單一個案菌株中，以 spoligotyping 進行篩檢²²，並以商用試劑 GenoType MTBC²³ 及 multiplex PCR²⁴ 進一步確認，共發現 15 株 (0.5%，15/3,321) 屬於 *M. bovis*。個案平均年齡為 62.2 歲，12 例(80%)為男性，9 例(60%)為原住民(OR=8.3, 95% CI 3.0 - 23.5)。10 位(66.7%)屬於新感染結核病個案，絕大部分感染 *M. bovis* 個案菌株(73%，11/15)為臺灣東部個案(OR=7.4, 95% CI 2.4 - 23.4)，但本次分析菌株總數 3,321 菌株僅 903(27.2%)株屬於東部。有 2 例(個案 2 及 3)有畜產動物接觸史，所有 *M. bovis* 菌株基因分型均為 ST684。此結果與 spoligotyping 進行菌株基因分型之 SpolDB4 基因資料庫中，主要 3 種 *M. bovis* 菌株基因型，ST482，683 及 479²⁵ 有所不同。

2006 及 2007 年，本實驗室持續針對例行存菌菌株庫中之結核菌進行固定比例篩選及個案菌株送驗確認。合計 2006 及 2007 年分別確認感染 *M. bovis* 個案 5 及 3 例。而自 2010 年 2 月至 2012 年 6 月間，實驗室持續進行菌株監測，發現南投及彰化共 7 例人感染 *M. bovis* 菌株之結核病個案，經由分局協助疫調結果，5 名有鹿的接觸史，其中 3 名仍持續養鹿，養鹿時間自 3-30 年不等，由於臺灣並無針對鹿隻進行全面結核菌素檢測，故不排除感染源來自鹿隻。依據我國畜產統計資料顯示，2012 年第三季鹿飼養以南投縣 197 場，7090 頭最多。依 2012 臺灣結核病防治年報資料顯示，2010 及 2011 年南投縣每年結核病新案發生數為 393 及 412 例。

目前進行 *M. bovis* 之菌株鑑定方法學，已知有商品化試劑 spoligotyping 及 GenoType MTBC 等，於實際應用上，spoligotyping

受限雜交膜使用次數限制，需一次操作 45 件檢體才符合經濟效益；GenoType MTBC 雖可單一進行，但相對成本高達新臺幣 1000-1200 元，上述兩方法所需操作時間均近一工作天(8 小時)。因此發展簡易牛型結核菌之快速檢測方法，除可彈性接受不同數目檢體檢測外，2-3 小時的操作時間更能快速獲得結果，避免因感染牛型結核病患者使用第一線藥物時，進行 PZA 之無效治療。

因此本計畫目的：(1) 建立一快速 *M. bovis* 檢測方法，(2) 以一年為區間，選擇臺灣養鹿場及數目最多的南投縣為監測區域，分析南投縣結核病個案菌株，以了解高風險發病區的牛型結核病比例；同時本計畫將持續進行當年疑似 *M. bovis* 感染個案菌株之通報鑑定，以期能建立一完整的實驗室監測網絡。

材料與方法

研究設計:

- (一) 將3對引子對及3組專一性核酸探針合併在一反應中，進行多重螢光即時聚合酶連鎖反應，快速辨識結核菌群種類。
- (二) 收案對象以103年本署中區管制中心轄下中區(中彰投三縣市)通報結核病個案為主，計畫目的在調查特定畜養地區，通報為結核病個案感染牛型結核菌的比例。

一、材料

由醫療院所結核病實驗室分送至疾病管制署進行送驗鑑定或保存之 MTBC 菌株。

二、實驗方法

1 菌株處理

- 1.1 收集經實驗設計篩選後結核菌株，吸取 400 μL 液態培養陽性菌液，經 95 $^{\circ}\text{C}$ 不活化處理 20 分鐘後，以 13,500 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液，保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 備用。若試驗菌株因菌量保存因素，將次培養進行增菌後以上述步驟進行檢體重新取得。
- 1.2 在生物安全第三等級 (BSL-3) 實驗室之生物安全櫃中，在固態培養基以接種環 (0.5 μL) 挑出 1 環的菌，放入裝有 400 μL 1X TE 的 2 mL 微量離心管中，於乾熱器以 95 $^{\circ}\text{C}$ 不活化處理 20 分鐘，離心後取上清菌液進行實驗。

2 三色螢光即時聚合酶連鎖反應 (triplex real-time polymerase chain reaction) 的建立

利用 real-time PCR 裝置為技術平台，設計對結核菌群不同序列專一性的引子及核酸探針，進行聚合酶連鎖反應與多重螢光標的核酸探針雜交反應，以鑑別待測菌株檢體是否為結核桿菌群的菌種。

3 GenoType MTBC 試驗

(1) 配製核酸聚合酶液，單一檢體之核酸聚合酶液含以下配方：

試劑	體積 (μL)
PNM (GenoType [®] MTBC 試劑組)	35.0
不含氯化鎂之 10X 緩衝液	5.0
25 mM 氯化鎂溶液	5.0
DNA 聚合酶	0.18
檢體	5.0
總體積為	50

(2) 每管核酸聚合酶微量反應管含 45 μL 試劑混合液及 5 μL 的檢體。

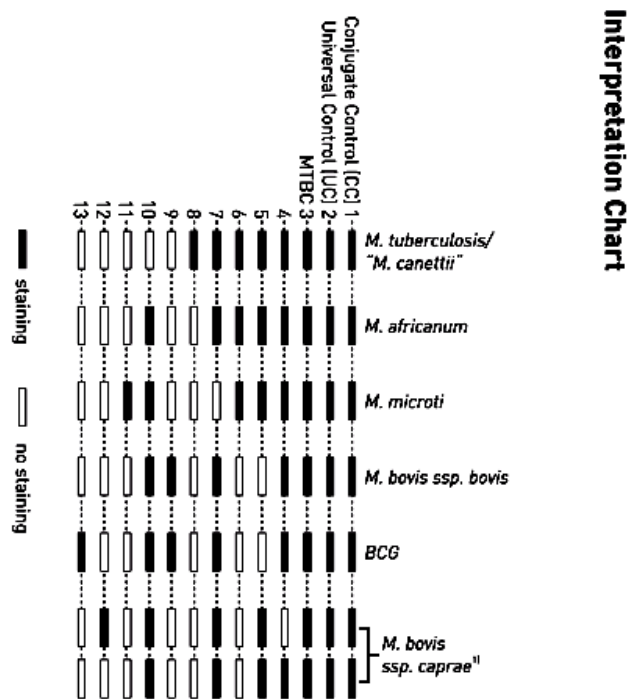
(3) 執行 PCR

步驟	溫度	時間
1. Enzyme Activation	95 °C	5 分鐘
2. Denature	95 °C	30 秒
3. Annealing	58 °C	2 分鐘
步驟 2.至步驟 3.循環重複 10 次		
4. Extension	95 °C	25 秒
	53 °C	40 秒
	70 °C	40 秒

步驟 4.循環重複 20 次		
5. Final extension	70 °C	8 分鐘
6. Store for o/n	16 °C	∞

(4) 雜交及呈色反應

(5) 結果判定：將核酸線性探針反向雜交紙片對齊貼在 GenoType® MTBC 評估表，依核酸線性探針反向雜交紙片之顯色位點來與比對表對照，得到菌株檢體之鑑定結果。



4. 結核菌群間隔寡核酸分子分型法(spoligotyping)

依實驗室所建置的標準操作流程進行。

5. 牛型結核病高風險發病區監測

由於本計畫另一目的為建立 *M. bovis* 實驗室監測系統，於特定畜養盛行區域進行人感染牛型結核菌之調查研究，監測將區分為兩部分進行：

(1)、回溯性監測研究

本年初實驗室與中區管制中心進行討論，先行選定南投縣國姓鄉為初步研究區域，希望藉由特定地區通報結核病個案菌株分析，了解 *M. bovis* 於該地區通報結核病個案菌株所佔比例。首先先由中區管制中心彙整南投縣國姓鄉近 10-15 年結核病個案清單，再由實驗室依清單勾稽是否有保存菌株並進行菌株鑑定。由於實驗室追溯最早該地區菌株收集始於 94 年，因此篩選自 94 至 102 年間，個案戶籍所在地為國姓鄉，共挑出 54 名個案的 58 株分枝桿菌(包含 NTM)菌株，以三色螢光 real-time PCR 及 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 進行鑑定。

(2)、前瞻性監測研究

收案對象以 103 年本署中區管制中心轄下中區(中彰投三縣市)通報結核病個案為主，分為實驗組及對照組。實驗組對象為 (1) 南投地區養鹿場工作人員及其接觸者(家庭成員)，並通報為結核病個案。(2) 南投地區結核病患(含疑似)被通報時，經問卷(附錄)確認個案具動物接觸史(動物接觸史定義為訪視當日一年內累積達三個月以上的(職場)接觸；動物以牛、羊及鹿)。對照組對象則以檢體送到衛福部彰化醫院檢驗且培養鑑定為 MTBC 之中、彰、投三縣市結核病通報個案。此監測並擬訂 7 題簡易勾選問卷，由中區管制中心協調基層公衛端協助詢問實驗組及對照組個案。所有進行研究的個案菌株均先以三色螢光 real-time PCR 進行快速篩檢，若結果為 *M. bovis* 或 *M. bovis* BCG 則再以 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 進行再確認。由於受限結核菌培養時間，全年度所有對照組個案菌株分析將無法於計畫結束前完成，因此對照組部分將回溯進行 102 年全年至 103 年

6 月底衛福部彰化醫院單一個案菌株的分析。

結 果

一、三色螢光即時聚合酶連鎖反應(triplex real-time polymerase chain reaction)的建立

1. 三色螢光 real-time PCR

即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)能針對特定基因作為生物標記(biomarker)，可即時、快速偵測檢體中是否存在特定病原體核酸，作為分子診斷工具。設計原理利用 MTBC、*M. bovis*、卡介苗(*M. bovis* BCG)之病原體在基因體上有無特定序列的差異，設計具有三色螢光探針 real-time PCR，以建立鑑定與區分 *M. bovis* family 菌株的快速診斷平台。三色螢光探針係分別利用 FAM 標示偵測 IS6110 專一性序列以鑑別 MTBC 及 NTM²⁶；VIC 標示用於將 *M. bovis* family 自 MTBC 區分；NED 標示則將確定 *M. bovis* BCG 疫苗株。

2. 標準 DNA 測試

以 1 ng 核酸濃度的 H37Rv、*M. bovis* 及 Tokyo 172 *M. bovis* BCG DNA 進行測試(圖一)，H37Rv (A)只出現 FAM 的擴增曲線，*M. bovis* (B)則有 FAM 及 VIC 各一擴增曲線，*M. bovis* BCG (C)同時出現 FAM、VIC、NED 三條擴增曲線，陰性對照組則沒有任何陽性擴增曲線結果(D)。

3. 三色螢光 real-time PCR 偵測極限

以 *M. bovis* DNA 取 1 ng/ μ L 進行 7 個濃度階的 10 倍序列稀釋，各濃度分別取 1 μ L 之核酸樣品上機，以評估三色螢光系統的偵測極限。結果顯示 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg 及 10 fg 均可出現 FAM (綠色) 及 VIC (藍色) 螢光陽性反應，同一螢光訊號依核酸濃度 10 倍稀釋逐次遞減約 3 Ct，最低稀釋核酸濃度 1

fg 三色螢光均無法偵測到陽性反應(圖二)。初步判定此三色螢光 real-time PCR 的核酸偵測極限為每一反應管 10 fg 核酸。

4. 評估方法學準確性

以 American Type Culture Collection (ATCC)等共 72 株分枝桿菌標準菌株，進行三色螢光 real-time PCR 測試，結果如表一。

34 株 MTBC 中 (含 12 株 *M. tuberculosis*、1 株 *M. africanum*、1 株 *M. microti*、3 株 *M. bovis* 及 17 株 *M. bovis* BCG)。結果顯示：

(1) *M. tuberculosis*、*M. africanum* 及 *M. microti* 只出現 FAM (IS6110)的陽性結果，VIC (*M. bovis*-family)及 NED (BCG)均為陰性。

(2) *M. bovis* 則出現 FAM 及 VIC (*M. bovis*-family)的陽性結果。

(3) *M. bovis* BCG 則同時有 FAM、VIC (*M. bovis*-family)及 NED (BCG)的陽性結果。

(4) 反之，38 株非結核分枝桿菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)均為 FAM、VIC (*M. bovis*-family)及 NED (BCG)陰性的結果。

因此，依三色螢光 real-time PCR 各螢光探針之陽性與陰性結果，可歸納鑑別出三種不同菌種 MTBC 的結果 (表二)。

二、牛型結核菌(*M. bovis*)的實驗室監測

(1) 年度例行送驗報告菌株之鑑定

本(103)年度累計至 11 月 12 日止，40 例個案菌株送至實驗室進行 MTBC (含 *M. bovis* 及 BCG) 鑑定，所有菌株均以 spoligotyping、GenoType[®] MTBC 等方法學進行鑑定。再利用此三色螢光 real-time PCR 平台進行盲樣測試，結果顯示所有 27 株 *M. bovis* BCG、9 株 *M. bovis*、4 株 *M. tuberculosis* 三色螢光

real-time PCR 結果與原發送報告結果完全一致(表三)。其中本年度於高屏區及苗栗各送驗一例從事養鹿畜產工作疑似 *M. bovis* 感染菌株鑑定，高屏區個案菌株經鑑定為 *M. tuberculosis*，然苗栗送驗個案菌株經分析確認為 *M. bovis*。

(2) 特定目的送驗鑑定菌株

針對中部某結核病檢驗單位疑似鑑定出 8 株 *M. bovis* 菌株，包含 2012 年 4 株、2013 年 3 株、2014 年 1 株。8 名個案居住地分別為高雄 1 名、臺南 1 名、彰化 1 名及台中 5 名。經本署中部區管中心聯繫送驗，原疑似鑑定 *M. bovis* 菌株經三色螢光 real-time PCR 檢驗，共確認 7 株屬 *M. bovis*。另 1 菌株由三色螢光 real-time PCR 檢測為 *M. bovis* BCG，上述 8 例結果亦經 spoligotyping 與 GenoType[®] MTBC 等方法學確認鑑定結果一致；檢測為 *M. bovis* BCG 個案為 74 歲，具膀胱癌病史，結核病治療記錄標示為肺外檢體並註記為泌尿及生殖系統結核，該菌株應屬於膀胱癌治療之卡介苗菌株。

(3) 牛型結核病高風險發病區監測

3.1 回溯性監測研究

自 94 至 102 年間，個案戶籍所在地為國姓鄉，結核病確定個案數總計 115 例，實驗室依保存菌株挑選出共 54 名個案之 58 株分枝桿菌(包含 NTM)菌株，以三色螢光 real-time PCR 確認有 41 個案(44 株)為 *M. tuberculosis*、5 個案(6 株)為 *M. bovis* 及 8 個案(8 株)為 NTM。6 株 *M. bovis* 經 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 確認為 *M. bovis*。依實驗室保存菌株數估計，初步估計本署實驗室保存該地區結核菌群菌株中，*M. bovis* 比例為

10.9% (5/46)。

3.2 前瞻性監測研究

表四為計畫期程以三色螢光 real-time PCR 檢出的 *M. bovis* 陽性個案，總數 29 例個案中，沒有一例符合「103 年中區通報結核病個案，為養鹿場工作人員/其家屬，或具有動物接觸史之 *M. bovis* 感染個案」之條件，僅 4 名個案為 100 年及 102 年通報個案具有動物接觸史或為養鹿人家，故本年度計畫執行至今，尚缺乏 103 年中部三縣市（中彰投）符合定義之實驗組個案。

進一步分析對照組結果，102 年部彰醫院共計 375 例(510 菌株)個案存菌，分別來自臺中市、彰化縣、南投縣等縣市(圖三 A)。經三色螢光 real-time PCR 進行菌種鑑定，共有 11 例(案 5-案 15) *M. bovis* 陽性個案(表四)，亦經 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 確認為 *M. bovis*，扣除該年份因其他送驗項目已發送報告之個案，新發現 8 例 *M. bovis* 陽性個案；11 例個案中，男性 6 例(54.5%)，年齡 19 至 76 歲，中位數 44 歲；2 名個案於傳染病通報系統中註記為肺外結核(消化道結核及胸肋膜結核)。於 102 年部彰醫院送本署存菌 375 例結核病通報個案中，*M. bovis* 確認個案佔該院存菌個案之比例為 2.9% (11/375)。11 名個案分布區為：苗栗縣苗栗市、臺中市豐原區、臺中市太平區、南投縣草屯鎮、南投縣仁愛鄉、南投縣國姓鄉(亦屬於國姓鄉回溯性監測研究個案)、高雄市苓雅區(個案為就讀臺中市東海大學非畜牧相關科系學生)各有 1 名個案；南投縣信義鄉則有 4 名，其中 1 名新案其親屬亦為先前確認之 *M. bovis* 個案。

103 年 1 至 6 月共計 250 名(342 菌株)個案存菌，各來自臺中市、彰化縣、南投縣、苗栗縣、嘉義縣(圖三 B)。經三色螢光 real-time

PCR 進行菌種鑑定，有 3 名個案(案 27-案 29)檢測結果為 *M. bovis*，此結果亦經 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 確認。個案分布地區為台中市太平區(亦為前述中部某結核病檢驗單位菌種鑑定之個案)及豐原區，另一個案屬南投縣信義鄉；此 3 名個案均為新案。

表四為 29 名 *M. bovis* 確認個案分析結果，含部彰醫院 14 名、國姓鄉回溯調查 5 名(1 名與部彰個案重覆)、中部檢驗機構送驗 7 名(1 名與部彰個案重覆)、4 名為本年度報告發送個案、1 名為部彰個案之親友回溯調查。分析個案的戶籍所在地，以南投縣國姓鄉及信義鄉各有 6 人最多，臺中市豐原區 5 人、臺中市太平區 2 人，其他鄉鎮區各為 1 人；男性占 23 人 (79.3%)；3 人為肺外結核；個案通報年齡介於 19 至 86 歲，中位數 55 歲。

討 論

一、三色螢光 real-time PCR 檢測法

1. 檢驗正確性

由表一與表二可知本計畫所發展三色螢光 real-time PCR 檢測法，能區別 *M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 與其餘 MTBC 菌種，亦可排除非 MTBC 的菌種(如 NTM)，與現有的 GenoType[®] MTBC 及 spoligotyping 等方法學相較，對於上述菌種具有一樣的鑑定能力。

2. 檢驗成本考量

三色螢光 real-time PCR 一次操作至多 94 件檢體，檢驗全程扣除配製 PCR 混合液、檢體加樣，實際上機時間約 1.5 小時，94 件檢體可於 3 小時內完成檢測。單一檢體的檢驗成本僅需新臺幣 50 元(相當於 1.7 美元)。現有的 GenoType MTBC 一次可操作 1 到 20 件檢體，單一檢體的檢驗成本高達新臺幣 1000 至 1200 元；spoligotyping 受限雜交膜使用次數限制，需一次操作 45 件檢體(含陽性與陰性對照組)才符合雜交膜損耗的經濟效益；上述兩方法所需操作時間均接近一個工作天(8 小時)。相較現有菌種鑑定技術而言，三色螢光 real-time PCR 是一項省時省錢的診斷方法學，能以低廉的成本、更短的實驗診斷時間、一次實驗可操作更多的檢體，提升疾病防治與診斷的時效性、效率。

3. 設備與人員的需求

三色螢光 real-time PCR 檢體樣本為不活化的陽性培養菌株及萃取的核酸，其硬體設備需求，需包含基本電力供應、real-time PCR 儀器、試劑與檢體冷藏與冷凍設備等，且人員亦需要熟悉分子生物學的技術知識與能力，避免操作過程中的汙染導致偽陽性結果。

二、*M. bovis* 檢出比例及地區

1. 特定調查的 *M. bovis* 比例

- (1) 國姓鄉回溯性監測研究發現：9 年間(民國 94 至 102 年)本署實驗室保存該地區結核菌群菌株中，初步估計 *M. bovis* 所佔比例為 10.9% (5/46)
- (2) 部彰醫院前瞻性監測研究：102 年部彰醫院送本署存菌 375 例結核病通報個案中，*M. bovis* 佔該院存菌之比例為 2.9% (11/375)。

2. 全數 29 例 *M. bovis* 在不同鄉鎮市區的比例

- (1) 南投縣國姓鄉：在國姓鄉回溯性監測研究(94 至 102 年)及部彰醫院前瞻性監測研究(102 年 1 月至 103 年 6 月)，共發現 6 名 *M. bovis* 感染個案，查詢本署傳染病統計資料查詢系統 2005 年至 2014 年國姓鄉結核病通報 104 例，由於並非全部 104 例菌株均能順利取得進行分析，*M. bovis* 個案初步估計比例至少為 5.8% (6/104)。
- (2) 南投縣信義鄉：查詢本署傳染病統計資料查詢系統 100 年至 103 年 5 月信義鄉結核病通報個案通報 40 例，本計畫發現 6 名 *M. bovis* 陽性個案，初步估計比例至少為 15% (6/40)。此 6 名個案有 4 名之戶籍均位於南投縣信義鄉某特定村落。
- (3) 臺中市豐原區：查詢系統自 2013 年至 2014 年 5 月為止，臺中市豐原區結核病通報 94 例，初步估計 *M. bovis* 比例至少為 5.3% (5/94)。其中 3 名個案戶籍所在地集中在 1 公里以內的範圍內。

與 2013 年 Borna Muller 等人的研究分析全球 5 大區域 (非

洲、美洲、歐洲、東地中海區及西太平洋區)人感染牛型結核病的資料相比，初估西太平洋區澳洲、紐西蘭及中國某部分，分別為 0.2%、2.7%及 0.2%⁷；南投縣國姓鄉、信義鄉及臺中市豐原區研究之數據與上述地區比較，有較高的現象，值得進一步研究。

三、潛在的感染族群及未知的感染途徑

本年度計畫並未監測到符合實驗組的陽性個案，推測可能原因為 102 年之前檢出畜產從業人員感染 *M. bovis* 個案後，公衛端落實接觸者檢查及相關衛教宣導，致本年度尚未有該區域任何畜產從業人員通報疑似 *M. bovis* 感染事件。

但由部彰醫院存菌的對照組發現有狩獵習慣的個案(表四之案 3 及案 15)與案 12，此 3 名個案問卷資料顯示均有生吃打獵獵物內臟(飛鼠)的習慣，顯然中部地區存在高風險的 *M. bovis* 感染族群，應該不只侷限於目前所設定實驗組的兩類對象。故合理地推測，除了養鹿畜產以外的畜牧人員(包含國內畜牧相關科系的師生、獸醫、及實習牧場工作人員)、有狩獵習慣的特定族群，甚至是研究高山野生動物的研究人員，都有可能是潛在的高風險族群；但此推論是否意味著臺灣山區野生動物可能存在著保菌宿主，仍無法斷定，尚需要更多研究證明，但肯定的是在防治上，需要檢討更完善的機制，阻斷目前已知傳染途徑。另外值得注意的是，多數對照組 *M. bovis* 陽性個案，並未有明確的動物接觸史，亦未食用未經巴斯德滅菌的畜牧製品，其存在的感染源仍有待釐清。

四、臨床監測的應用

1. 臨床實驗室的監測

目前臺灣結核病臨床實驗室人員普遍都具有良好的微生物及分

子生物操作能力，亦導入檢驗品質系統確保檢驗從操作、試劑、報告發送都納入品管，因此將此技術導入臨床實驗室的應用應無執行上的困難；執行上較大的阻力，是一部需同時具備 FAM、VIC、NED 三種螢光訊號偵測的 real-time PCR 儀器進行檢驗。

2. 監測區域的推展

本計畫本年度僅針對臺灣中部為研究區域且利用單一醫院的存菌，在數據的分析上可能造成偏差，尚無法代表臺灣中部地區的人類 *M. bovis* 感染的全貌，因此只有全面執行通報結核病個案菌株的分析，才能了解 *M. bovis* 在某一區域所佔的比例。

針對本年度例行送驗報告菌株之鑑定，一例個案從事養鹿畜產工作且菌株經鑑定為 *M. bovis*，然個案所轄縣市(苗栗縣)並非屬於本計畫年初設定的實驗組別(南投縣)，因此無法進一步分析可能影響因素，但據此結果仍可推估我國其他縣市從事畜產工作的從業人員，仍是受 *M. bovis* 感染的高風險群。

重要研究成果及具體建議

綜合以上，此三色螢光 real-time PCR 可作為 MTBC 區別 *M. tuberculosis*、*M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 的快速鑑定平台，在所得結果與現有 spoligotyping 與 GenoType® MTBC 方法學結果一致的檢驗正確性之下，其檢驗成本亦相對低廉，可以有效提升檢驗量能。

在建立 *M. bovis* 實驗室監測系統，在 625 例對照組中，使用三色螢光即時聚合酶連鎖反應檢出 14 例 *M. bovis* 陽性個案，其中 10 例為應用此方法學第一次篩出的新案，該 10 例個案均無養鹿畜產的接觸史及疑似通報 *M. bovis* 感染，顯示此診斷平台具有高通量及公衛監測的效果。未來的研究應優先強化監測系統進行所有可能造成感染途徑的疑似個案而非只侷限具養鹿接觸史。由於此方法學建立所需要的設備及技術，與現今臨床實驗室執行分子檢測相關實驗相當，故在能力訓練後應可推廣上線；唯個別實驗室之人力負擔狀況不同，需考量個別實驗室應用時所進行的檢驗量。全國性的 *M. bovis* 實驗室監測系統可以有效發現 *M. bovis* 感染個案，讓病人得到適當治療外，所提供的流行病學資訊更可以促進防疫政策的改進。

此外，此三色螢光 real-time PCR 亦可適用 5 歲以下兒童疑似卡介苗不良反應或膀胱癌治療個案之培養菌株，進行 *M. bovis* BCG 菌種鑑定。

參考文獻

1. Cosivi O, J Grange, C Daborn, M Raviglione, T Fujikura, D Cousins, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;**4**:59-70.
2. Thoen C, P Lobue and I de Kantor. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006;**112**:339-45.
3. Grange JM and MD Yates. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994;**40**:137-51.
4. Gutierrez M, S Samper, MS Jimenez, JD van Embden, JF Marin and C Martin. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:3328-30.
5. Cousins DV, R Bastida, A Cataldi, V Quse, S Redrobe, S Dow, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:1305-14.
6. Bovine Tuberculosis. *The Center for Food Security & Public Health* 2007. Access 20 October 2013, From: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf.
7. Muller B, S Durr, S Alonso, J Hattendorf, CJ Laisse, SD Parsons, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013;**19**:899-908.
8. Mawak J, N Gomwalk, C Bello and Y Kandakai-Olukemi. Human pulmonary infections with bovine and environment (atypical) mycobacteria in jos, Nigeria. *Ghana Med J* 2006;**40**:132-6.

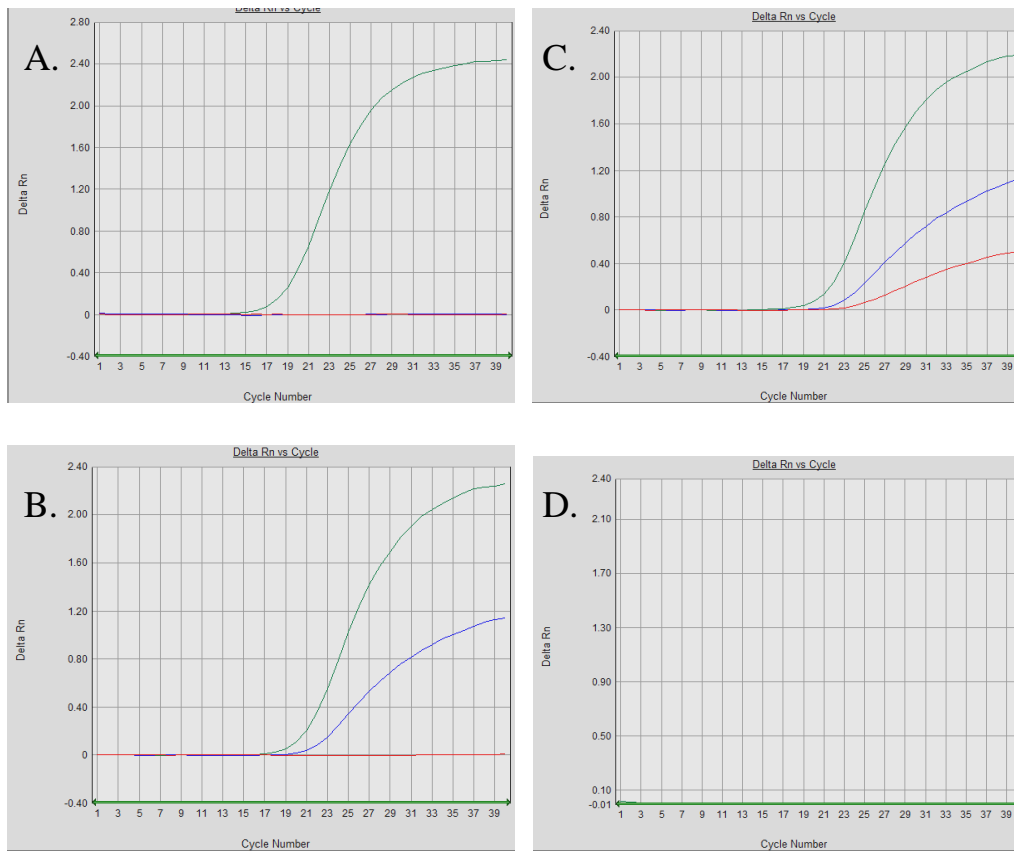
9. WHO Working Group on Zoonotic Tuberculosis, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (Mycobacterium bovis)*. Mainz, Germany: World Health Organization; 1995.
10. Mfinanga SG, O Morkve, RR Kazwala, S Cleaveland, MJ Sharp, J Kunda, et al. Mycobacterial adenitis: role of *Mycobacterium bovis*, non-tuberculous mycobacteria, HIV infection, and risk factors in Arusha, Tanzania. *East Afr Med J* 2004;**81**:171-8.
11. Kazwala RR, CJ Daborn, JM Sharp, DM Kambarage, SF Jiwa and NA Mbembati. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;**5**:87-91.
12. Cicero R, H Olivera, A Hernandez-Solis, E Ramirez-Casanova and A Escobar-Gutierrez. Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;**28**:455-60.
13. Ordoñez PT, FM Sauzo, MAS Flores and ICR Casillas. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Veterinaria México* 1999;**30**:227-9,.
14. Pérez-Guerrero L, F Milián-Suazo, C Arriaga-Díaz, C Romero-Torres and M Escartín-Chávez. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública Méx* 2008;**50**:286-91.
15. Hlavsa MC, PK Moonan, LS Cowan, TR Navin, JS Kammerer, GP

- Morlock, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008;**47**:168-75.
16. Rodwell TC, M Moore, KS Moser, SK Brodine and SA Strathdee. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis* 2008;**14**:909-16.
 17. LoBue PA and KS Moser. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994-2003. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;**9**:333-8.
 18. (CDC) CfDCaP. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*--New York City, 2001-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;**54**:605-8.
 19. LoBue PA, W Betacourt, C Peter and KS Moser. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;**7**:180-5.
 20. Samper S, MJ Iglesias, MJ Rabanaque, LI Gomez, MC Lafoz, MS Jimenez, et al. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:1220-7.
 21. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. *Annual report*. Taipei: Council of Agriculture Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Executive Yuan, Taiwan; 2005.
 22. Kamerbeek J, L Schouls, A Kolk, M van Agterveld, D van Soolingen, S Kuijper, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:907-14.

23. Richter E, M Weizenegger, S Rusch-Gerdes and S Niemann.
Evaluation of Genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:2672-5.
24. Yeboah-Manu D, MD Yates and SM Wilson. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *J Clin Microbiol* 2001;**39**:4166-8.
25. Brudey K, JR Driscoll, L Rigouts, WM Prodinger, A Gori, SA Al-Hajj, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006;**6**:23.
26. Cleary TJ, G Roudel, O Casillas and N Miller. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4783-6.

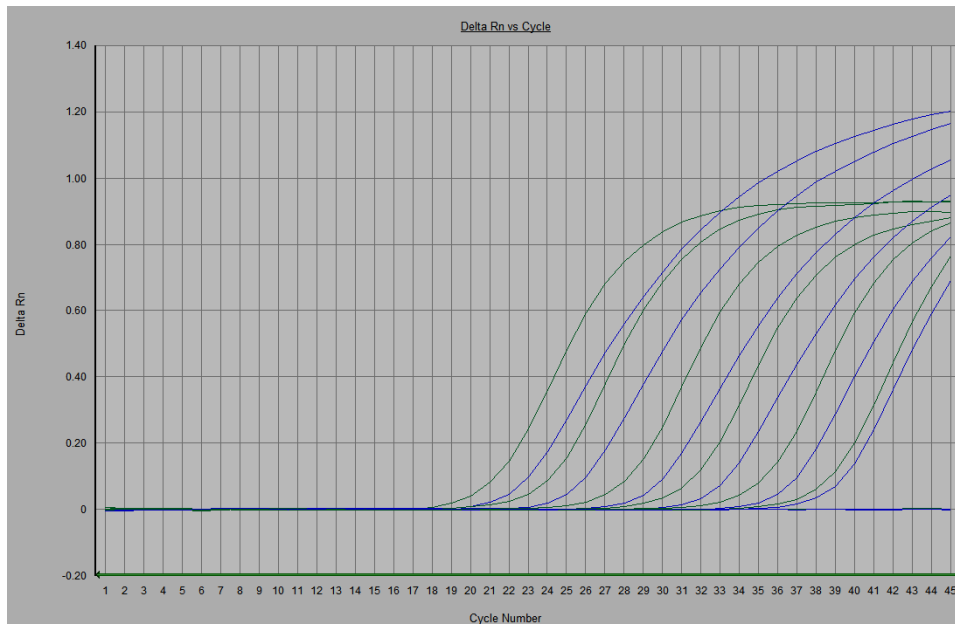
圖、表

圖一、三色螢光 real-time PCR 鑑別不同 MTBC 菌種



A. *M. tuberculosis* H37Rv 1 ng DNA ; B. *M. bovis* 1 ng DNA ; C. *M. bovis* BCG Tokyo 172 1 ng DNA ; D. 陰性對照組 (ddH₂O) 。綠線為 FAM (IS) ; 藍線為 VIC (*M. bovis*-family) ; 紅線為 NED (BCG) 。 X 軸為 Cycle number (Ct 值) , Y 軸為螢光強度 。

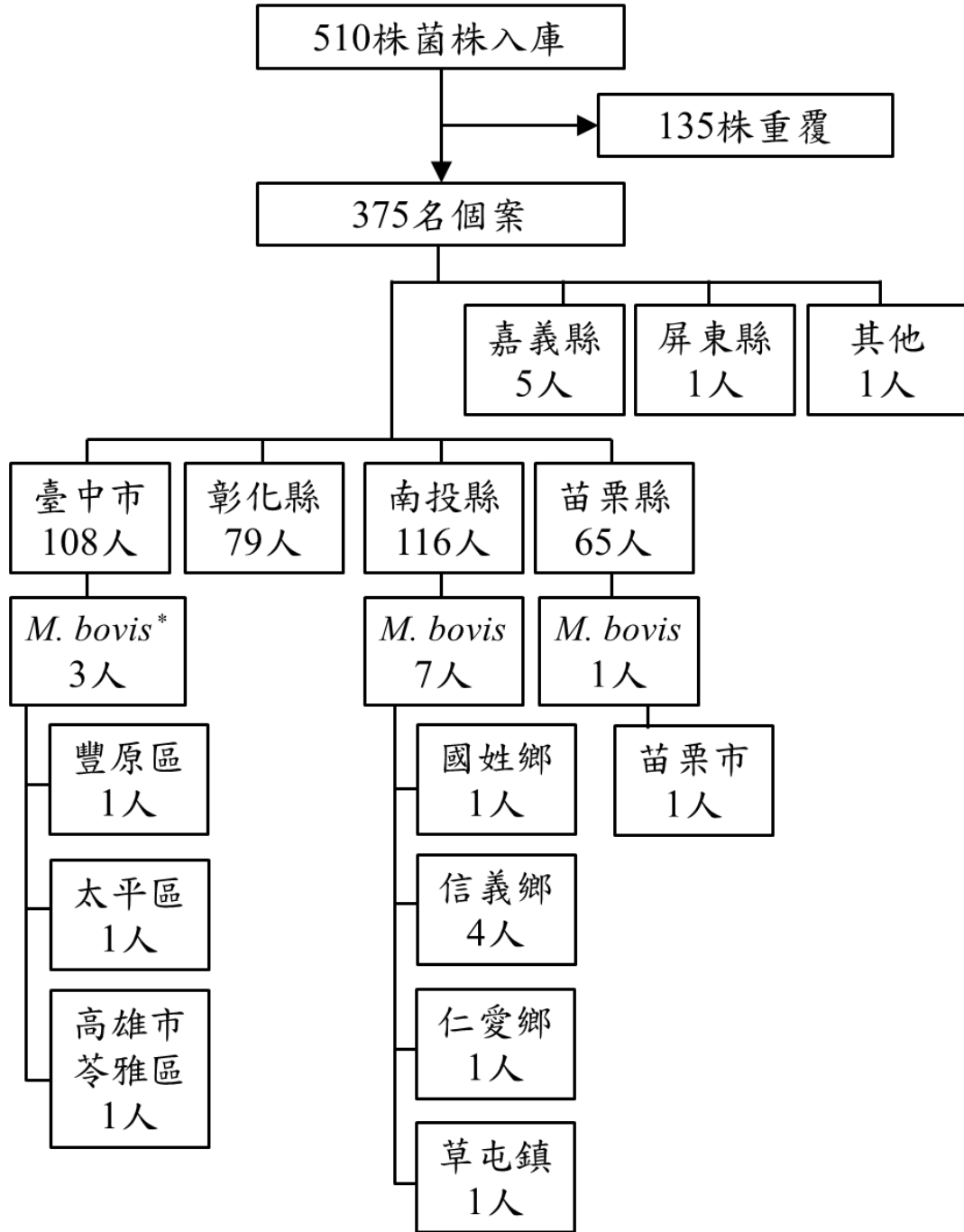
圖二、三色螢光 real-time PCR 的偵測極限



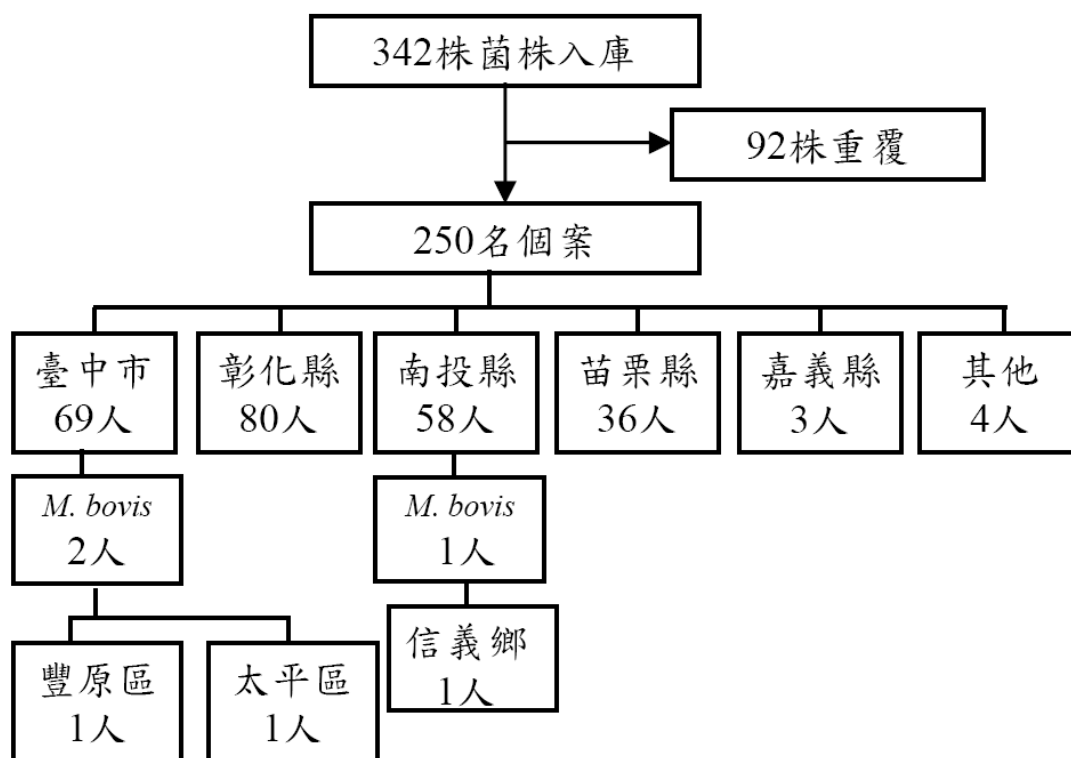
綠線為 FAM (IS)；藍線為 VIC (*M. bovis*-family)。同一顏色擴增曲線出現順序之 DNA 量為 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg 及 10 fg。

圖三、部彰醫院個案地域分析

A. 實驗對照組(部彰醫院2013年存菌)



B. 實驗對照組(部彰醫院2014年1-6月存菌)



A. 部彰醫院 102 年存菌及個案收案(1 人 1 株 MTBC); *註記說明: 1 名個案就讀臺中市西屯區東海大學, 其戶籍所在為高雄市苓雅區。

B. 部彰醫院 103 年 1 至 6 月存菌及個案收案(1 人 1 株 MTBC)。

表一、標準菌株測試三色螢光 real-time PCR 結果

Strain	FAM-IS	VIC-Bovis	NED-BCG	No. of strain(s)
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	12
<i>M. microti</i>	+	-	-	1
<i>M. africanum</i>	+	-	-	1
<i>M. bovis</i>	+	+	-	3
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+	17
<i>M. avium</i>	-	-	-	4
<i>M. abscessus</i>	-	-	-	2
<i>M. chelonae</i>	-	-	-	2
<i>M. flavescens</i>	-	-	-	2
<i>M. fortuitum</i>	-	-	-	3
<i>M. gastri</i>	-	-	-	1
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	5
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	1
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	3
<i>M. kansasii</i>	-	-	-	2
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	2
<i>M. marinum</i>	-	-	-	1
<i>M. nonchromogenic</i>	-	-	-	1
<i>M. peregrinum</i>	-	-	-	1
<i>M. phlei</i>	-	-	-	1
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-	1
<i>M. simaie</i>	-	-	-	2
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	1
<i>M. triviale</i>	-	-	-	1
<i>M. xenopi</i>	-	-	-	2

表二、三色螢光 real-time PCR 結果判定說明

鑑定菌種	FAM-IS	VIC-Bovis	NED-BCG
不含 MTBC 核酸(如水、NTM)	-	-	-
非 <i>M. bovis</i> family 之 MTBC (含 <i>M. tuberculosis</i> 、 <i>M. africanum</i> 、 <i>M. microti</i>)	+	-	-
<i>M. bovis</i> (non-BCG strain)	+	+	-
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+

表三、2014 年送驗 MTBC 菌株經三色螢光 real-time PCR 之菌種鑑

定結果

Species	FAM-IS	VIC-Bovis	NED-BCG	No.
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	4
<i>M. bovis</i>	+	+	-	9
<i>M. bovis</i> BCG	+	+	+	27

表四、三色螢光 real-time PCR 檢出 *M. bovis* 陽性個案分析

個案	採檢年份	年齡	性別	戶籍所在地	抽樣類別	其他說明
案 1	95	69	男	南投縣國姓鄉	國姓鄉抽樣，個案已死亡	
案 2	100	56	男	南投縣國姓鄉	國姓鄉抽樣，100 年已發報告	
案 3	100	51	男	南投縣信義鄉	101 年抽菌	具野生動物接觸史
案 4	100	62	男	南投縣國姓鄉	國姓鄉抽樣，100 年已發報告	
案 5	102	20	女	台中市豐原區	部彰抽樣，102 年已發報告	
案 6	102	40	男	南投縣信義鄉	部彰抽樣，新案	
案 7	102	67	女	南投縣信義鄉	部彰抽菌；同 101 年抽菌，已發報告	
案 8	102	76	男	南投縣仁愛鄉	部彰抽樣，新案，個案已死亡	
案 9	102	19	男	高雄市苓雅區	部彰抽樣，新案	
案 10	102	53	女	苗栗縣苗栗市	部彰抽樣，新案	
案 11	102	37	男	南投縣國姓鄉	國姓鄉抽樣；部彰抽樣，新案	肺外(消化道)結核
案 12	102	52	女	南投縣信義鄉	部彰抽樣，新案	具野生動物接觸史
案 13	102	70	女	台中市太平區	部彰抽樣；103 年已發報告菌	
案 14	102	44	男	南投縣草屯鎮	部彰抽樣，新案	肺外(肺肋膜)結核
案 15	102	44	男	南投縣信義鄉	部彰抽樣，新案	具野生動物接觸史
案 16	100	83	男	南投縣國姓鄉	國姓鄉抽菌；102 年已發報告菌	
案 17	101	52	男	高雄市楠梓區	中部送驗	
案 18	101	71	男	台南市柳營區	中部送驗	
案 19	101	72	男	台中市梧棲區	中部送驗	
案 20	101	72	男	彰化縣二林鎮	中部送驗	
案 21	102	81	女	台中市豐原區	中部送驗，個案已死亡	
案 22	102	48	男	台中市豐原區	中部送驗	
案 23	103	51	男	彰化縣鹿港鎮	103 年已發報告菌	
案 24	102	78	男	南投縣國姓鄉	103 年已發報告菌	養鹿人家
案 25	102	86	男	台中市豐原區	103 年已發報告菌	
案 26	103	31	男	彰化縣溪湖鎮	103 年已發報告菌，個案已死亡	肺外(消化道)結核
案 27	103	65	男	台中市太平區	中部送驗；部彰抽樣	
案 28	103	50	男	台中市豐原區	部彰抽樣，新案	
案 29	103	55	男	南投縣信義鄉	部彰抽樣，新案	

附 錄

中區牛型分枝桿菌結核病調查問卷

一、基本資料

姓名：_____

二、動物接觸史

1. (發病前) 是否有養動物？

否

是 (養動物時間點請勾選)

發病一年內累積達三個月以上 發病 2-9 年內 發病 10 年前

動物種類：_____，飼養時間：_____年_____月

2. (發病前) 三年內是否有打獵習慣？

無

有 獵物種類：_____

打獵地點：_____

打獵頻率：每年_____次

3. (發病前) 三年內是否曾到觀光牧/農場旅遊？

否

是

牧場名稱：_____

接觸動物種類與接觸方式：_____

4. (發病前) 是否曾從事畜牧工作？ 否 是

三、飲食史

1. (發病前) 三年內是否飲用未經低溫殺菌的生奶、生奶？

否

是 → 生牛奶 生羊奶 其他：_____

生奶來源(產地或商店)：_____

2. (發病前) 三年內是否曾食用鹿相關製品？

否

是 (生鮮鹿茸片、鹿茸粉、鹿茸酒、鹿血、鹿奶等)

環境調查

1. 住家附近有無畜牧場？

無

有 → 同住家地址

地址：_____

距離住家約：_____ (公尺/公里)