

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-113704

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：牛結核菌感染人及動物之檢驗、監測與流行調查

106 年度全程研究報告

執行單位：疾病管制署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：翁瑞芸

執行期間：106 年 01 月 01 日至 106 年 12 月 15 日

目 錄

目 錄	2
中英文摘要	4
本 文	7
前言	7
材料與方法	12
結果	15
【一】、確認方法學及運用監測	15
【二】、執行動物檢體核酸分析	18
【三】、 <i>M. bovis</i> 菌株分子抗藥及基因型結果	20
討論	21
重要研究成果及具體建議	29
參考文獻	31
圖、表	35
圖一、評估微量及正常體積之三色螢光即時定量 PCR 結果	35
圖二、實驗組 14 例 <i>M. bovis</i> 個案地理標示圖	36

表一、人通報結核病個案菌株之實驗室監測	37
表二、動物組織核酸鑑別分析結果	38
表三、34 株 <i>M. bovis</i> 一、二線藥物分子抗藥及基因分型結果	39

中英文摘要

中文摘要

三色螢光即時定量 PCR，可直接應用於人感染牛結核菌的菌株及臨床檢體的鑑別診斷。本研究運用監測上，實驗組 723 例共計檢測出 14 例 *M. bovis* 個案(1.9%)，對照組 203 例僅檢測出 1 例 *M. bovis* 個案(0.49%)。多數 *M. bovis* 檢測陽性個案，並未有動物接觸史。

由動物組織檢體之核酸分析，發現 9 件培養陽性並鑑定為 *M. bovis* 的牛組織核酸中，7 件成功鑑別並直接由螢光訊號判定為 *M. bovis*。若以培養鑑定結果為標準，敏感度、專一性、陽性預測值、陰性預測值及準確性，為 77.8%、93.8%、87.5%、88.2% 及 88%。

2015-2017 年 34 株 *M. bovis* 菌株之 isoniazid (INH) 分子抗藥結果顯示：7 株(20.6%)為 INH 單一抗藥，其中 1 株具 *katG* S315T 高濃度抗藥位點突變及 4 株具 *inhA-r* C-15T 低濃度抗藥位點突變，另 2 株 INH 抗藥菌株並未發現 *katG* 或 *inhA-r* 突變。所有 34 株 *M. bovis* 菌株均發生 *pncA* H57D 位點突變，此位點為明確的 PZA 抗藥。Spoligotyping 基因分型共發現 3 種型別：31 株(91.2%)為 ST 684 型別(SB 0265)，與牛隻培養出之菌株相同，屬於臺灣 *M. bovis* 主要流行型別，另 2 型則為 ST 683(1 株)及 ST 1158(2 株)。人畜共通牛結核病之即時判定及長期監測，建議納入結核病防治重要策略之一。

關鍵字：牛型結核菌、菌種鑑定、人畜共通傳染病、三色螢光即時定量 PCR

英文摘要

We developed a triplex fluorescence real-time PCR that can be directly applied to the differential diagnosis of strains and clinical specimens infected with *Mycobacterium bovis*. A total of 14 *M. bovis* cases (1.9%) and one *M. bovis* (0.49%) were detected in the experimental group and the control group, respectively. Most *M. bovis* cases had no history of exposure to animals. For analyzing animal tissue specimens, 7 of the 9 bovine tissue culture-positive specimens were identified as *M. bovis*. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy were 77.8%, 93.8%, 87.5%, 88.2% and 88%, respectively. Of the 34 *M. bovis* isolates identified from 2015 to 2017, 7 (20.6%) were resistant to INH, one had high-level resistance harboring the *katG* S315T mutation and 4 had low-level resistance showing *inhA-r* C-15T mutation, and the other two did not find *katG* or *inhA-r* mutations. All 34 *M. bovis* isolates had *pncA* H57D mutation, this site is a marker for PZA drug resistance. We found 3 spoligotypes including the major type, 31 (91.2%) were ST 684 (SB 0265), one ST 683 (2.9%) and two ST 1158 (5.8%).

Keywords: *Mycobacterium bovis*, species identification, zoonosis, triplex real-time PCR

本 文

前 言

牛型結核菌(*Mycobacterium bovis*)屬一人畜共通的結核病，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，全球主要的動物結核病絕大部分是由 *M. bovis* 造成，病兆為產生肉芽腫結節，乾酪樣結節及鈣化，病原體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，先天對 Pyrazinamide (PZA) 具有抗藥性。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而獲得，屠宰場及牧場人員為高危險群³。國際間普遍認定，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此疾病的目的，但此項策略在其他國家並不成功。進一步研究，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⁴。

過去 20 年間，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，有效篩選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⁵，非洲地區感染 *M. bovis* 約占該區所有結核病的2.8%，最嚴重的3個國家，為衣索比亞、奈及利亞及坦尚尼亞，*M. bovis* 約占該國所有結核病的17%、15.4%及26.1%^{6,7,8,9}；美洲地區感染 *M. bovis* 約占該區所有結核病的0.3%，墨西哥為該區最嚴重的區域，*M. bovis* 約占該國所有結核病的7.6%^{10,11,12}。在美國感染牛型結核病經調查強烈與西班牙裔社區有關¹³，特別是來自墨西哥裔的移民，經由公衛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^{14,15,16,17}。歐洲感染 *M. bovis* 約占該區所有結核病的0.4%，西班牙甚至發生2起多重抗藥 *M. bovis* 造成的院內感染¹⁸。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¹⁹，2005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。對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作法。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%。2014年動植物防疫檢疫局年報指出2014共完成98,953隻乳牛，44,881隻乳羊及9,305隻鹿之結核菌素測試，但檢驗陽性數未提及。若依2016年第一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²⁰，並以商用試劑 GenoType MTBC²¹ 及 multiplex PCR²² 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，10 位(66.7%)屬於新感染結核病個案，此研究絕大部分感染 *M. bovis* 個案菌株(73%，11/15)為台灣東部個案(OR=7.4, 95% CI 2.4–23.4)，但菌株總數 3,321 菌株僅 903(27.2%)株屬於東部。個案中有 2 例有畜產動物接觸史，所有 *M. bovis* 菌株基因分型均為 ST684。此結果與 spoligotyping 之 SpolDB4 基因資料庫中，主要 3 種基因型，ST482，683 及 479 有所不同²³。

2006 及 2007 年，實驗室持續針對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 2016 年 8 月間，實驗室持續進行菌株監測，發現南投及彰化共 9 名感染 *M. bovis* 菌株之結核病個案，經由分局疫調結果，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，因此不排除感染源來自鹿隻。

由於目前進行 *M. bovis* 之菌株鑑定方法學，已知有商品化試劑 spoligotyping 及 GenoType MTBC 等，然於實際應用上，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，但相對成本高達新台幣 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，同時可避免感染牛型結核病患者使用第一線藥物時，進行 pyrazinamide 之無效治療。

計畫團隊於 2014 年已建立一快速 *M. bovis* 檢測方法，為利用即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)，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。設計原理利用結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)、牛型結核菌(*M. bovis*)、卡介苗(*M. bovis* BCG)及非 MTBC 之病原體在基因體上有無特定序列的差異，設計具有三色螢光即時定量 PCR 探針的 real-time PCR，以建立鑑定與區分 *M. bovis* family 菌株的快速診斷平台。三色螢光即時定量 PCR 探針係分別利用 FAM 標示偵測 IS6110 專一性序列以鑑別 MTBC 及 NTM；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。

本年度計畫預計實施方法：(1)將此項技術平台導入人及動物疑似結核病個案之鑑別檢測；(2)進行陽性菌株或檢體之基因分型；(3)進行流行病學調查；(4)架構熱點監測網絡，期望能在牛型結核菌相對高發生地區，於人通報結核菌群(MTBC)中快速篩檢牛型結核菌，避免因此菌株先天對 pyrazinamide 抗藥及可能對 isoniazid 的抗藥性，而造成病人臨床治療的疑慮。計畫將除持續進行高風險牛型結核菌區域

的實驗室監測，預計同時與防檢局及家畜衛生試驗所合作，進行人畜
共通牛型結核病感染源的探索。

材 料 與 方 法

研究設計與方法

材料:

1. 醫療院所結核病實驗室分送至疾病管制署進行保存之結核菌群(MTBC) 菌株。
2. 家畜試驗所收集之材料：動物組織核酸(106 年第 3 次本署生物安全委員會會議決議，同意進行合作分析之檢體類別)。

實驗方法：

一、人及動物疑似感染牛結核菌之鑑別檢測

1. 人通報結核病個案菌株:

實驗設計篩選之培養陽性結核菌株，吸取 0.1 mL 菌液，經 95°C 不活化處理 20 分鐘後，以 13,500rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液，保存於-20°C 備用。

2. 動物疑似感染牛結核菌組織檢體處理(家衛所提供):

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% CO₂ 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基因分型試驗(spoligotyping)確認是否為*M. bovis*。另取0.5 mL均質液，以 QIAamp純化管柱進行組織檢體核酸萃取，所得純化核酸進行 IS 6110 real-time PCR已確認該組織檢體是否含有結核菌群核酸。

3. 結核菌群 (MTBC)、*M. bovis* 及 BCG 核酸確認(個案菌株檢體及家衛所組織核酸檢體)

以疾管署自行發展之即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)，針對特定基因作為生物標記(biomarker)，作為分子診斷工具。分別將結核菌群(MTBC)、牛型結核菌(*M. bovis*)、卡介苗(*M. bovis* BCG)及非 MTBC 之病原體在基因體上有無特定序列的差異，設計具有三色螢光即時定量 PCR 探針 triplex real-time PCR，分別以人

通報結核病個案菌株及家衛所純化之組織核酸進行試驗，以評估快速診斷鑑定 *M. bovis* 核酸的可行性。

二、菌株基因分型分析

由疾病管制署以 spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)、結核桿菌散置重複單元-可變重複序列分子分型法 (mycobacterial interspersed repetitive units - variable numbers of tandem repeats, MIRU-VNTR) typing 等不同基因標幟方法，進行 *M. bovis* 基因分型及建置資料庫。

三、*M. bovis* 菌株分子抗藥結果分析

為求實驗數據具代表性，選取不同年份，菌株數至少超過 20 株之 *M. bovis*，進行一、二線藥物分子抗藥結果分析，以了解我國感染牛型結核病個案之 *M. bovis* 菌株之分子抗藥現象。

四、流行病學調查

M. bovis 陽性結果立即回饋本署各區管制中心及農方，以利個案流行病學調查，期建立一完整的實驗室監測網絡。

結 果

1. 確認方法學及運用監測

(1) 確認方法學

計畫所開發之三色螢光即時定量 PCR 技術偵測設備，係使用 2004 年購置之即時定量 PCR 系統，該系統偵測濾片因長期使用已逐漸損耗，本計畫遂以 2016 年新購置之多重螢光偵測平台，進行此三色螢光即時定量 PCR 試驗，同時調校三色螢光即時定量 PCR 訊號閾值設定，以完整呈現原始設計時之參數設定。由於新偵測平台具有微量體積可反應優勢，4 株待測菌株及陽陰性對照組核酸進行原倍（25 μ L）及一半體積（12.5 μ L）的三色螢光即時定量 PCR 偵測評估（圖一）。

減半體積之反應陽性 Ct 值為：No.1-4 為待測菌株檢體，

No.1 (IS / Bovis / BCG 分別為 17.29/18.17/20.43)，

No.2 (IS / Bovis / BCG 分別為 13.59/undet./undet.)，

No.3 (IS / Bovis / BCG 分別為 18.84/19.63/undet.)，

No.4 (IS / Bovis / BCG 分別為 22.60/undet./undet.)；

而原倍體積之反應陽性 Ct 值為：

No.1 (IS / Bovis / BCG 分別為 16.69/18.39/20.44)，

No.2 (IS / Bovis / BCG 分別為 12.59/undet./undet.)，

No.3 (IS / Bovis / BCG 分別為 18.03/19.82/undet.)，

No.4 (IS / Bovis / BCG 分別為 20.98/undet./undet.)。結果顯示反應體積減半，三色螢光即時定量 PCR 偵測平台於待測菌株檢體及標準核酸樣本，所得螢光訊號陽陰性之判定結果均與原正常體積結果相同。

(2) 運用監測:進行人通報結核病個案之 *M. bovis* 實驗組及對照組的實驗室監測

菌株抽樣設計為(1)實驗組：選取北、中、南、東各一家實驗室存菌，篩選條件為 2015 年菌株例行基因分型監測出現 2 株 *M. bovis* 之實驗室，由於中部區域為 *M. bovis* 重點監測區，故以地緣關係再選擇另一家實驗室，合計 5 家合約實驗室，以一人一株保存菌株進行檢測分析，共分析 732 株菌株；(2)對照組則為其它實驗室存菌，以 10 株抽 1 株進行，共分析 203 株菌株 (表一)。所有經三色螢光即時定量 PCR 檢測為 *M. bovis* 或 BCG 之結果，均需再次以線性核酸探針試驗 (LPA)與 spoligotyping 基因分型試驗確認，檢測為 *M. tuberculosis* 結果則以 spoligotyping 再次確認。

人口學資料顯示，實驗組及對照組男性比例均超過 70%

(73.5% 及 71.9%)，女性比例為 28.1% 及 26.5%，2 組別男性發病年齡層中位數均為 66 歲，大於 61 歲以上占最多數。實驗組及對照組女性發病年齡層中位數分別為 59 及 67 歲，大於 61 歲以上同樣占最多數。

732 株實驗組 MTBC 菌株，共檢出 14 株 *M. bovis* 菌株，佔 1.91%，依個案地理位置標示於臺灣地圖如圖二，分別為北部 1 例，中部 10 例，其中改制後的台中市 6 例，南投縣 4 例，南部 3 例，分別為改制後高雄市 2 例及屏東縣山地鄉 1 例。TB 個案管理紀錄顯示 14 例個案均無畜產動物接觸史。其中 10 株 *M. bovis* 來自實驗組 5 家實驗室中特定 1 家，佔實驗組 *M. bovis* 全部個案數 71.4%。14 例 *M. bovis* 個案中，年齡層範圍 16-79 歲，中位數 54 歲。其中男性 10 例(71.4%)，發病年齡最小為 22 歲。女性 4 例(28.6%)，發病年齡最小為 16 歲。13 例為本國籍，僅 1 例個案為 35 歲之外籍聘僱女性。2 例檢測為 BCG 個案均為 2016 年出生，性別男女各一，菌株來源均為卡介苗接種不良反應培養陽性菌株。另有 3 例檢測結果為陰性，重複試驗結果亦同，其中 2 例經另一結核菌群專一性核酸探針(16S)試驗判定為 *M. tuberculosis*；另一例 16S 核酸探針試驗及後續基因分型試驗結果均為陰性，研判

此保存菌管內應無結核菌。

203 株對照組 MTBC 菌株，僅檢測出 1 株 *M. bovis*，佔 0.49%，該案為一居住於北部山地鄉 60 歲女性個案；3 例 BCG 檢出個案均為 2016 年出生，2 例男性及 1 例女性，菌株來源同樣為卡介苗接種不良反應培養陽性菌株。

2. 執行動物檢體核酸分析

本(2017)年度 4 月爆發雲林牧場 53 頭乳牛感染人畜共通牛結核病事件，因此探討已開發完成之三色螢光即時定量 PCR 技術應用於相關畜產動物檢體之可行性評估。此項分析，係由淡水家衛所人員攜帶畜產動物感染部位純化之核酸檢體，至本署分枝桿菌實驗室。以本署所提供之偵測設備及檢測試劑，並由分枝桿菌實驗室研究人員操作實驗，評估畜產動物檢體核酸檢測之可行性。由於此合作項目涉核酸檢體攜出及農衛雙方檢測技術合作，須由雙方各自完成行政簽核程序及雙方生安會討論同意後始進行，分枝桿菌實驗室於本年 7 月下旬向生安委員會提案並獲同意後始進行。

總數 40 件經家衛所純化之動物組織核酸檢體，包含 25 件牛及 15 件鹿隻組織檢體。檢體類別及培養鑑定如下：(1)25 件牛組

織檢體中，有 9 件培養陽性並鑑定為 *M. bovis*。25 件中，13 件咽背淋巴結(Pharyngcal LN)，3 件培養陽性；8 件縱膈淋巴結/咽背淋巴結(Mediastinal /Pharyngcal LN)，4 件培養陽性；1 件腸繫淋巴結/腰部淋巴結(Mediastinal /Waist LN)培養陽性；1 件肺組織(Lung)培養陽性及 2 件腸繫淋巴結(Mediastinal LN)，培養結果陰性。(2) 15 件鹿組織檢體，11 件培養陽性並鑑定為 *M. bovis*。15 件中，11 件咽背淋巴結(Pharyngcal LN)，7 件培養陽性；2 件肺組織(Lung)培養陽性；2 件腸繫淋巴結(Mediastinal LN)培養陽性。

總數 25 件牛組織核酸檢體，共 9 件培養陽性並經家衛所執行基因分型試驗後，確定為 *M. bovis*。家衛所以該所之 IS 6110 real-time PCR 檢出 5 件判定為 MTBC 陽性結果，本署三色螢光即時定量 PCR 則檢測出 7 件判定為 *M. bovis* 陽性反應(包含 5 件家衛所陽性結果)；16 件培養陰性結果中，家衛所均未檢出 MTBC 陽性結果，本署三色螢光即時定量 PCR 檢出 1 件判定為 *M. bovis* 陽性反應，餘 15 件均為陰性結果。若以培養鑑定結果為標準計算，2 項檢測之敏感度、專一性、陽性預測值、陰性預測值及準確性，家衛所 IS 6110 real-time PCR 為 55.6%、100%、100%、80% 及 84%；本署三色螢光即時定量 PCR 則為 77.8%、93.8%、87.5%、

88.2%及 88%。另，15 件鹿組織核酸檢體，共 11 件培養陽性並經家衛所基因分型試驗確定為 *M. bovis*。家衛所檢出 5 件判定為 MTBC 陽性結果，本署檢出 6 件判定為 *M. bovis* 陽性反應(含括 5 件家衛所陽性結果)。4 件培養陰性結果中，家衛所及本署均未檢出 MTBC 陽性結果。若以培養鑑定結果為標準，2 項檢測之敏感度、專一性、陽性預測值、陰性預測值及準確性，家衛所基因分型試驗為 45.5%、100%、100%、40%及 60%，本署三色螢光即時定量 PCR 則為 54.5%、100%、100%、44.4%及 66.7%。

3. *M. bovis* 菌株分子抗藥及基因型結果

選取 2015-2017 年間，34 株 *M. bovis* 菌株分別進行一線藥物抗藥基因 *rpoB*、*katG*、*inhA-r*、*embB*、*pncA*，二線藥物抗藥基因 *gyrA*、*gyrB*、*rrs*、*eis* 進行定序分析。傳統一線藥物感受性實驗結果，除編號 4 及 12 菌株於追管系統中查無藥敏試驗結果外，其餘 32 株具藥敏試驗結果菌株中，7 (21.8%)株為單一 INH 抗藥，其餘 25 株均為敏感。此 7 株單一 INH 抗藥菌株中，1 株有 *katG* S315T 突變，另有 4 株有 *inhA-r* C-15T 突變。*rpoB* 及 *embB* 抗藥基因均未發現有突變，而所有 34 株菌株於 *pncA* 抗藥基因皆發生 H57D 位點突變，即此 34 株 *M. bovis* 均為 PZA 抗藥。至於，二線藥物抗藥

基因 *gyrA*、*gyrB*、*rrs*、*eis* 定序結果均未發現位點突變。再者，Spoligotyping 基因分型結果，34 株菌株共分為 3 種基因型，除 1 株 ST 683 (BOV_2)(2.9%)及 2 株 ST 1158 (BOV_3)(5.9%)外，其餘 31 株 *M. bovis* 均為 ST 684 (BOV_1)(91.2%)，且 7 株單一 INH 抗藥菌株均屬 ST 684。MIRU 基因分型結果，除原 3 株 BOV_2 及 BOV_3 各為不同基因型外，另 31 株 ST 684 *M. bovis* 菌株，分為 6 種基因型，主要發生變異的位點為 Mtub04 (2 株)、VNTR4120 (1 株)、QUB3232 (3 株)，34 株 *M. bovis* 菌株以 MIRU 分析可分為 9 種基因型。

討 論

1. 確認方法學及運用監測

計畫團隊於 2014 年建立一快速牛型結核菌(*M. bovis*)檢測方法並申請我國專利中(專利申請案號第 103145871 號)。關鍵技術為利用即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)，針對特定基因作為生物標記(biomarker)設計成分子診斷工具，可即時、快速偵測特定病原體核酸。設計原理利用結核菌群(MTBC)、*M. bovis*、卡介苗(*M. bovis* BCG)及非 MTBC 之病原體在基因體上有無特定序列的差異，設計具有三色螢光即時定量 PCR 探針的 triplex real-time PCR，以建立鑑定與區分 *M. bovis* family 菌株的快速診斷平台。三色螢光即時定量 PCR 探針係分別利用 FAM 標示偵測 IS6110 專一性序列以鑑別 MTBC 及 NTM；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。此螢光偵測的核酸極限為每一反應體積為 10 fg。確效(validation)試驗係以 American Type Culture Collection (ATCC)等共 72 株分枝桿菌標準菌株，進行三色螢光即時定量 PCR triplex real-time PCR 測試，其中 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 的陽性結果，VIC (*M. bovis*-family) 及 NED (BCG) 等螢光訊號均為陰性。由於 *M. africanum* 及 *M. microti* 於我國結核病通報個案中尚未發現臨床病例，因此若此三色螢光即時定量 PCR 結果僅出現 FAM 訊號，除判為 MTBC 外，可進一步推論應屬 *M. tuberculosis*。(2) *M. bovis* 則出現 FAM 及 VIC (*M. bovis*-family) 的陽性螢光訊號結果。(3) *M. bovis* BCG 則同時有 FAM、VIC (*M. bovis*-family) 及 NED (BCG) 的陽性螢光訊號結果。(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) 的螢光訊號陰性結果。此項技術以標準菌株測試評估之 sensitivity、specificity、PPV、NPV 及 accuracy 均為 100%。

本計畫研究結果證實，可使用一半之反應體積，獲得相同的鑑別結果。因此在菌株檢體的未來應用上，可考慮將反應體積減半，即減少一半試劑費用，仍可獲得一致的結果。然由於總反應體積減半，即樣本加樣體積亦減半，與正常反應體積相較，初步評估陽性 ΔC_t 值約略小於 1。因此若應用於菌株檢體時，核酸含量高將不致於有太大數值改變；但若應用臨床微量檢體檢測時，陽性臨界值之判定或有偵測極限之問題，因此若

使用於臨床微量檢體檢測時，仍建議使用原倍反應體積(25 μ L)及 5 μ L 加樣樣本。

於運用監測上，原設定全年度完成 300 株 MTBC 菌株快速鑑別分析，由於本年度 4 月爆發雲林牧場 53 頭乳牛感染人畜共通牛結核病事件，本計畫遂增加分析數量，嘗試擴大分析確診通報為結核病個案菌株之鑑別，期中報告進度已完成 353 株，至本年 11 月止，合計完成 935 株菌株。菌株之原始檢體採檢日為 2016 年 10 月起至 2017 年 6 月止。實驗組 732 例共計檢測出 14 例 *M. bovis* 個案(1.9%)，對照組 203 例僅檢測出 1 例 *M. bovis* 個案(0.49%)，2 組別檢出 *M. bovis* 比例相差 3.88 倍。顯示實驗組 5 家實驗室中，其中一家實驗室因地理區域或個案職業習慣等因素，所保存之 MTBC 菌株存在一定高比例的 *M. bovis*。尤其是 4 例南投縣個案中，其中 1 例個案與本署 2014 年研究相同，戶籍均位於南投縣信義鄉雙龍村，推論該村落住民仍持續接觸 *M. bovis* 感染源導致住民陸續發病。值得注意的是，多數 *M. bovis* 陽性個案，並未有動物接觸史，亦未食用未經巴斯德滅菌的畜牧製品，其感染源仍有待釐清。

2 例實驗組個案，於此三色螢光即時定量 PCR 偵測平台檢測結果為陰性，進一步以另一核酸探針(16S)檢測均為陽性，

spoligotyping 結果均為同一 undefined 型別且 MIRU 型別相同，懷疑此 2 個案菌株於三色螢光即時定量 PCR 探針之 FAM-IS 出現變化，另以 IS 6110 重複片段之另一組不同位置引子，進行核酸複製實驗，其結果仍為陰性，初步推論此 2 例個案菌株應不存在結核菌群特有之 IS 6110 片段基因。另一例實驗組陰性結果，以多種核酸複製方法均顯示為陰性，推測此菌株保存管應無結核菌存在，送存菌實驗室須加強品管流程內控。扣除該無結核菌之樣本，於總數 934 件 MTBC 檢體中，三色螢光即時定量 PCR 偵測技術之 sensitivity、PPV 及 accuracy 分別為 99.8%、100% 及 99.8%。

2. 執行動物檢體核酸分析

由於本計畫為第一次農衛雙方針對動物組織檢體核酸進行 *M. bovis* 檢測合作應用，相關行政流程需完備後始能進行試驗分析。於純化組織核酸後，家衛所原執行之 real-time PCR 係使用結核菌群核酸探針 (IS 6110)，故其陽性結果僅能判定為結核菌群 (MTBC) 核酸陽性反應，若要進一步判定是否為 *M. bovis*，則須待陽性培養菌株進一步進行基因分型試驗後確定。本署檢測系統則可於一次實驗中，成功研判菌株檢體是否含有 *M. bovis* 核酸，亦曾於病患呼吸道檢體中檢測出 *M. bovis*，後經病患培養

陽性菌株證實無誤。但此偵測平台尚未直接應用於動物組織核酸進行類似評估。

40件經家衛所純化之動物組織核酸檢體，絕大多數均為淋巴結組織檢體，牛及鹿隻主要檢體採集部位均以咽背淋巴結(Pharyngeal LN)為主，單純咽背淋巴結組織採檢培養陽性率相異，牛隻僅23% (3/13)，鹿隻則為64% (7/11)，有結節病灶之牛隻動物未能完全分離到病原顯示分離操作上尚有進步空間。雖然鹿隻病原分離之陽性率高，然而於核酸檢測上，本研究與家衛所結果類似，均未於多數陽性培養結果之原始檢體組織核酸中，偵測到MTBC抑或*M. bovis*核酸存在，是否於組織檢體純化核酸過程中，原始檢體取樣之誤差所致，值得進一步探討。

3.、*M. bovis* 分子抗藥分析

由於本年度運用監測上，實驗組及對照組共檢測出 15 株 *M. bovis*，尚無法完整評估此菌株的抗藥性資料。因此本年度先行分析 2015-2017 年確認之 34 株 *M. bovis* 菌株之分子抗藥結果，並比對原始菌株一線藥物感受性試驗，由於 PZA 抗藥試驗並非常規進行，故以 PZA 分子抗藥結果取代傳統藥敏試驗結果。一線藥物感受性試驗發現 7 株(20.6%)為 INH 單一抗藥，2 株(5.9%)無藥敏結果，其餘 25 株(73.5%)一線藥物皆為敏感。7 株 INH 單一抗藥菌株

中，1 株具 *katG* S315T 高濃度抗藥位點突變及 4 株具 *inhA-r* C-15T 低濃度抗藥位點突變，另 2 株 INH 抗藥菌株並未發現 *katG* 或 *inhA-r* 突變。所有 34 株 *M. bovis* 菌株均發生 *pncA* H57D 位點突變，此位點為明確的 PZA 抗藥。此結果與國際間普遍認為 *M. bovis* 為典型 PZA 抗藥一致；然發表於 2005 年 MMWR 的研究指出¹⁶，2001-2004 年於美國紐約市發現 35 例人感染 *M. bovis* 的個案，17 例(49%)僅對 PZA 抗藥，14 例(40%)對 PZA 及 SM 抗藥，2 例(6%)對 PZA、INH、SM 抗藥，1 例(3%)對 PZA 及 INH 抗藥，另 1 例均無抗藥。與本研究相較，此次分析 34 株 *M. bovis* 菌株，27 株(79.4%)僅對 PZA 抗藥，另 7 株(20%)為對 PZA 及 INH 抗藥，抗藥類型較為單純。另同時分析此 34 株二線藥物抗藥基因定序結果，尚未發現有任何二線藥物基因突變現象，顯示若能在第一時間針對個案菌株進行鑑別診斷，可避免感染牛型結核病患者使用第一線藥物時，進行 pyrazinamide 之無效治療。同時絕大多數 INH 抗藥菌株均屬 INH 低濃度抗藥，臨床醫師對病患治療應無太多疑慮。

2008 年研究團隊曾發表 2004-2005 年臺灣 15 例 *M. bovis* 個案之流行病學調查²⁴，15 例個案菌株基因型均為 ST 684，與本次研究 2015-2017 年 34 株菌株相較，本次研究多增加 ST 683 (1 株)及 ST 1158 (2 株)等 2 種 spoligotyping 型別。由於 spoligotyping 所分

離的 *M. bovis* 有另一國際間資料庫(<http://www.mbovis.org/>)可進行比對，家衛所於 2013、2016 年發表 2 篇自乳牛分離之 *M. bovis* 菌株研究指出^{25,26}，Spoligotyping 中的 SB0265 型(相當於 ST 684)，流行於法、德、加拿大等，為台灣的主要流行型別，分布於全臺灣，約佔家衛所保存 *M. bovis* 菌株之 70.6%。SB0140 型(相當於 ST 683)，流行於英國等歐洲國家，為台灣的次要流行型別，主要出現在雲林、嘉義及屏東，佔家衛所保存 *M. bovis* 菌株之 22.4%。SB1040 型(相當於 ST 1158)，主要流行於南美洲巴西、墨西哥等，為台灣少見之型別，調查報告中僅出現於嘉義及新竹某牧場。與本次分析 34 株 *M. bovis* 相較，31 株(91.2%)為 ST 684 型別(SB 0265)，與牛隻培養菌株相同，均屬於臺灣 *M. bovis* 主要流行型別，此型別菌株相當普遍，不易釐清感染源，可能須借助全基因體技術分析結果協助判定；菌株編號 15 之個案，為 ST 683 型別(SB 0140)，個案於 2013 年曾在雲林縣崙背鄉某牧場工作達 3 年，家衛所之牧場調查研究報告指出，該型別個案與牧場有縣市地緣關係；菌株編號 16、18 個案菌株，為 ST 1158 型別(SB 1040)，家衛所調查報告此型別僅出現於嘉義及新竹，然本研究 2 例個案居住地為高雄及彰化，且無動物養殖接觸史，除非此 2 例個案曾前往嘉義及新竹等牧場，否則此型別推測仍有其他感染源尚未釐清。

重要研究成果及具體建議

三色螢光即時定量 PCR 偵測平台可直接應用於人感染 *M. bovis* 的菌株及臨床檢體的鑑別診斷，於本署新購置的螢光偵測平台，使用減半試劑量仍可獲得相同之結果判定。運用監測上，實驗組 5 家實驗室中，732 例共計檢測出 14 例 *M. bovis* 個案(1.9%)，對照組 203 例僅檢測出 1 例 *M. bovis* 個案(0.49%)，實驗組中一家實驗室因地理區域或個案職業習慣等因素，所保存之 MTBC 菌株存在一定高比例的 *M. bovis*。尤其是 1 例南投縣個案中，與 2014 年研究相同，戶籍均位於南投縣信義鄉雙龍村，推論該村落住民仍持續接觸 *M. bovis* 感染源導致住民陸續發病。值得注意的是，多數 *M. bovis* 陽性個案，並未有動物接觸史，亦未食用未經巴斯德滅菌的畜牧製品，其感染源仍有待釐清。

本計畫與農方合作，利用三色螢光即時定量 PCR 偵測技術，進行動物組織檢體核酸分析，確定其應用之可行性，於 9 件培養陽性並鑑定為 *M. bovis* 的牛組織核酸中，7 件成功鑑別為 MTBC 並進一步由螢光訊號判定為 *M. bovis*。以培養鑑定結果為標準，敏感度、專一性、陽性預測值、陰性預測值及準確性，為 77.8%、93.8%、87.5%、88.2% 及 88%。唯針對鹿隻檢體之檢出陽性值偏低的原因，仍需持續分析。

2015-2017 年之 34 株 *M. bovis* 菌株分子抗藥結果，7 株(20.6%) 為 INH 單一抗藥，1 株具 *katG* S315T 高濃度抗藥位點突變及 4 株具 *inhA-r* C-15T 低濃度抗藥位點突變，另 2 株 INH 抗藥菌株並未發現 *katG* 或 *inhA-r* 突變。所有 34 株 *M. bovis* 菌株均發生 *pncA* H57D 位點突變，此位點為明確的 PZA 抗藥。Spoligotyping 共 3 種型別，31 株 (91.2%) 為 ST 684 型別(SB 0265)，與牛隻培養菌株相同，屬於臺灣 *M. bovis* 主要流行型別，另 2 型則為 ST 683(1 株)及 ST 1158(2 株)。

具體建議

1. 與農方、相關研究牛結核病等獸醫單位及大學相關系所進行跨單位合作。
2. 加強高風險區鑑別診斷，推廣此項檢測技術至區域具分子生物學檢測能力之實驗室，進行早期培養陽性菌株鑑別診斷。

參考文獻

1. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:59–70.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid0401.980108>
2. Thoen C, Lobue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol*. 2006;112:339-45.
3. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol*. 1994;40:137-51.
4. OIE, 2005. Bovine Tuberculosis,
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf
(accessed 5 April 2005).
5. Muller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C.J.M, Parsons S.D.C, Helden P.D.van, and Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:899–908.
6. Mawak J, Gomwalk N, Bello C, Kandakai-Olukemi Y. Human pulmonary infections with bovine and environment (atypical) mycobacteria in Jos, Nigeria. *Ghana Med J*. 2006;40:132–6.
7. World Health Organization. Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), with the participation of the FAO; 14 June, 1994; Mainz, Germany. Geneva: The Organization. 1994;1–45 [cited 2012 April 13].
http://whqlibdoc.who.int/hq/1994/WHO_CDS_VPH_94.137.pdf
8. Mfinanga SG, Morkve O, Kazwala RR, Cleaveland S, Sharp MJ,

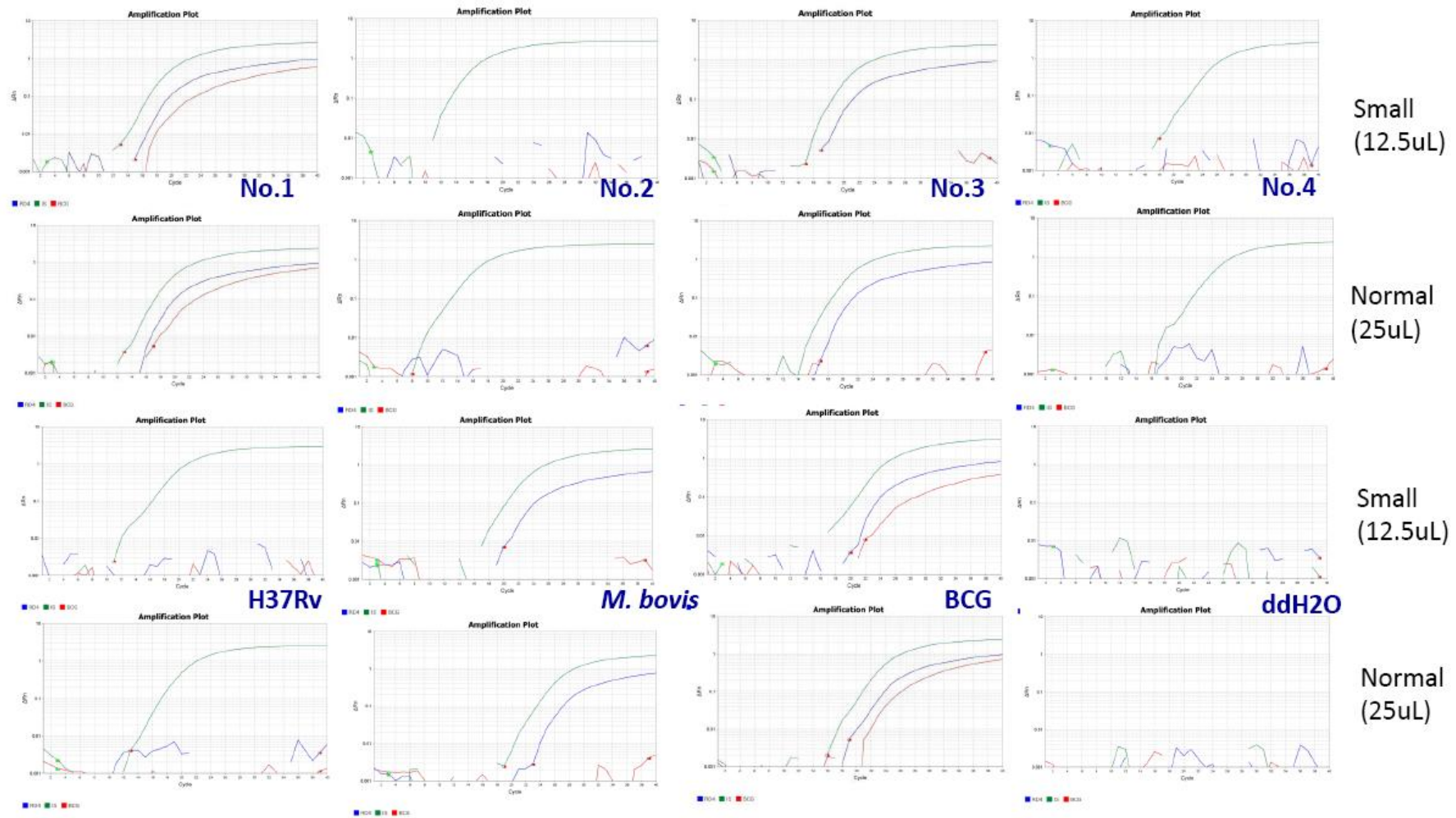
Kunda J, et al. Mycobacterial adenitis: role of *Mycobacterium bovis*, non-tuberculous mycobacteria, HIV infection, and risk factors in Arusha, Tanzania. *East Afr Med J*. 2004;81:171–8.

<http://dx.doi.org/10.4314/eamj.v81i4.9150>

9. Kazwala RR, Daborn CJ, Sharp JM, Kambarage DM, Jiwa SF, Mbembati NA. 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.
10. Cicero R, Olivera H, Hernandez-Solis A, Ramirez-Casanova E, Escobar-Gutierrez A. 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0649-5>
11. Ordóñez PT, Milian SF, Santillán FMA, Ramírez CIC. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos [in Spanish with English translation]. *Veterinaria (Mex)*. 1999;30:227–9 [cited 2012 April 13].
<http://www.redalyc.org/pdf/423/42330303.pdf>
12. Pérez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartin-Chávez M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Publica Mex*. 2008;50:286–91.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342008000400006>
13. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in

- the United States, 1995–2005. *Clin Infect Dis*. 2008;47:168–75.
<http://dx.doi.org/10.1086/589240>
14. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:909–16.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid1406.071485>
15. LoBue PA, Moser KS. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994–2003. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:333–8.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*—New York City, 2001–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005;54:605–8.
17. LoBue PA, Betacourt W, Peter C, Moser KS. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994–2000. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:180–5.
18. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gomez LI, Lafoz MC, Jimenez MS, et al. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1220–7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.3.1220-1227.2005>
19. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. Annual report. Taipei: The Bureau; 2005.
20. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin*

- Microbiol.* 1997;35:907–14.
21. Richter E, Weizenegger S, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2672–5.
22. Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4166–8.
23. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (Spol-DB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23–39.
24. Jou R, Huang WL, Chiang CY. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:515–517.
25. 黃春申、蔡洵洵、涂堅 101年牛結核病調查報告. 獸醫專訊. 2013;7:22-27.
26. 黃春申、涂堅、蔡向榮 2014年台灣牛型分枝桿菌基因型分析. 家畜衛試所研報. 2016;50:77-84.



圖一、評估微量及正常體積之三色螢光即時定量 PCR 結果



圖二、實驗組 14 例 *M. bovis* 個案地理標示圖

表一、人通報結核病個案菌株之實驗室監測

	實驗組	對照組
	實驗室數(5)	實驗室數(13)
總個案數 935	732	203
性別		
男性個案數(%)	538 (73.5)	146 (71.9)
女性個案數(%)	194 (26.5)	57 (28.1)
男性發病年齡層		
中位數 (範圍)	66 (0-99)	66 (1-98)
≤20	8	2
21-40	45	17
41-60	163	37
≥61	322	90
女性發病年齡層		
中位數 (範圍)	59 (1-97)	67 (1-97)
≤20	9	2
21-40	51	15
41-60	40	6
≥61	94	34
菌株鑑定結果		
<i>M. tuberculosis</i>	713	199
<i>M. bovis</i>	14	1
<i>M. bovis BCG</i>	2	3
undeterminate	3	-

表二、動物組織核酸鑑別分析結果

		Cattle (No=25)		Deer (No=15)	
		culture (+)	culture (-)	culture (+)	culture (-)
*CDC triplex real-time PCR (IS/Bovis/BCG)	positive	7	1	6	0
	negative	2	15	5	4
	sensitivity	77.8		54.5	
	specificity	93.8		100	
	PPV	87.5		100	
	NPV	88.2		44.4	
	accuracy	88		66.7	
**AHRI real-time PCR (IS)	positive	5	0	5	0
	negative	4	16	6	4
	sensitivity	55.6		45.5	
	specificity	100		100	
	PPV	100		100	
	NPV	80		40	
	accuracy	84		60	
specimen type	Pharyngeal LN	3	10	7	4
	Mediastinal /Pharyngeal LN	4	4	-	-
	Mediastinal /Waist LN	1	-	-	-
	Lung	1	-	2	-
	Mesenteric LN	-	2	2	-

*CDC, Centers for Disease Control; **AHRI, Animal Health Research Institute

