

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000107

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：人感染牛型結核病的快速檢測方法之應用評估（2-1-10）

104 年 度 全 程 研 究 報 告

執行單位：疾病管制署愛滋及結核病組

計畫主持人：黃偉倫

計畫協同主持人：周如文

研究人員：黃偉倫

執行期間：104 年 01 月 01 日至 104 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
結果	12
【一】牛型結核菌快速檢測技術平台於臨床認可實驗室進行評估， 供人畜共通傳染病檢驗用	12
【二】持續進行我國牛型結核菌實驗室監測牛型結核菌(<i>M. bovis</i>) 的實驗室監測	14
討論	17
重要研究成果及具體建議	22
參考文獻	23
圖、表	27
圖一、Precision test	27
圖二、Reproducibility test	28
圖三、Stability test	29
表一、臨床實驗室-A 進行 220 株液態培養陽性菌株評估結果	30

表二、48 株結核菌群菌株鑑定結果(Jan-Nov, 2015)	31
表三、 313 例抹片及培養 MTBC 陽性以 LPA(line-probe assay) 與 triplex real-time PCR 對原消化痰檢體鑑定 MTBC 陽性結 果比較	32
表四、3 例痰檢體以 triplex real-time PCR 檢出 <i>M. bovis</i> 結果	33

中英文摘要

中文摘要

牛型結核菌快速檢測技術平台在 precision、reproducibility 及試劑 stability 上，不論穩定度及應用時的準確性上，均獲得最佳化的結果。在臨床實驗室實地評估結果，總數 220 株檢體檢測結果顯示，不論是 169 (76.8%)株檢體經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陽性，抑或 51 (23.2%)株全經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陰性檢體，triplex real-time PCR 檢測具高專一性，分析敏感度、專一性、陽性預測值及陰性預測值均為 100%。

經兩年的評估結果，triplex real-time PCR 技術平台已證實可直接導入實驗室例行鑑別結核菌群(MTBC)鑑定流程。此外，評估臨床抹片陽性消化去污痰檢體，總數 313 例抹片及培養 MTBC 陽性的原消化痰檢體，以 LPA (line-probe assay)與 triplex real-time PCR 分別進行檢測，兩方法檢測陽性結果統計上並無差異。triplex real-time PCR 更可直接自痰檢體檢測出 3 例 *M. bovis* 個案，可建議進行所有疑似個案及高風險區通報結核病個案的前端痰檢體篩檢。

關鍵字：牛型結核菌、菌種診斷、人畜共通傳染病、三色螢光即時定量 PCR

英文摘要

Rapid detection of *Mycobacterium bovis* technology platform in the precision, reproducibility and reagent stability, both the accuracy and stability when applied, has received the best of the results. Field evaluated in clinical laboratory results, the total number of 220 sample test results show that both 169 (76.8%) strains by the ICT and triplex real-time PCR determination is MTBC positive, or the 51 (23.2%) isolates through ICT and triplex real-time PCR determination is negative result. Triplex real-time PCR has 100% sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value.

Evaluation in past two years, triplex real-time PCR technology platform has been proven to be directly introduced into laboratory routine of MTBC identification process. In addition, clinical assessment of smear-positive sputum specimen that were MTBC culture positive, the total number of 313 cases was tested compared LPA (line-probe assay) with triplex real-time PCR; two results did not differ statistically. Moreover, triplex real-time PCR detected three of *M. bovis* cases. It can be recommended using it for screening all suspected cases and sputum specimen that was notified TB cases in high-risk area.

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

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%。

目前實驗室例行進行 *M. bovis* 之菌株鑑定方法學，已知有商品化試劑 spoligotyping²¹、GenoType MTBC²²，實驗室自行建置的 multiplex PCR²³ 等，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，上述方法所需操作時間加上核酸複製、雜交試驗近一工作天(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，視檢體數不一，2-3 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。

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)²⁴，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。此方法已於2014年底提出專利申請(案號103145871)「快速檢測牛型結核菌及卡介苗株之方法」。設計原理係利用結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)、牛型結核菌(*M. bovis*)、卡介苗(*M. bovis* BCG)及非結核菌群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。三色螢光探針係分別利用FAM標示偵測 IS 6110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標示則進一步確定*M. bovis* BCG疫苗株。螢光偵測的核酸極限為每一反應體積為10 fg。探針診斷結果顯示：(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。(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 則同時出現FAM、VIC (*M. bovis*-family)及NED (BCG)的陽性螢光訊號結果。(4)反之，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。

本年度計畫選擇1家本署結核菌分生檢驗認可實驗室(A)合作，將此技術平台於臨床實驗室進行技術評估，以確認其可行性及準確性；同時持續進行年度疑似*M. bovis*感染個案菌株之通報鑑定，並進一步進行抹片陽性痰檢體之檢測成效，以期能建立一完整的實驗室監測網絡及早期偵測系統之評估。

材 料 與 方 法

研究設計與方法

【一】、牛型結核菌快速檢測技術平台於臨床認可實驗室進行評估，供人畜共通傳染病檢驗用。

(一) 預配混合液之品管確認

為減少及簡化在認可實驗室進行此項分生檢測平台的步驟，將所有須進行 real-time PCR 的試劑於本署實驗室預先混製，同時以一固定測試組菌株/核酸分別進行測試組 precision、reproducibility 及試劑 stability 評估，以了解預配混合液的穩定度及應用時的準確性。

(二) 檢體處理

選擇 1 家本署結核菌分生檢驗認可實驗室(A)合作，將此技術平台於臨床實驗室導入進行評估。收集 220 株該實驗室進行結核菌培養之液態培養陽性菌株，依檢驗流程先進行 ICT 測試，之後於液態培養管中吸取 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 冰箱以進行檢測及菌種分析。

(三) 結核菌群及 *M. bovis* 菌株確認

所進行的測試檢體，檢測結果為陽性將進行抽樣確認。

(四) 菌種鑑定

由疾病管制署分枝桿菌實驗室提供經評估完成預配的混合試劑組，於認可實驗室進行評估，測試結果與臨床端 ICT 鑑定結果互相比較。所有 ICT 及 triple real-time PCR 檢測為陰性的菌株檢體，將以 16S 定序、GenoType CM、GenoType AS 進一步進行菌種鑑定。

【二】、持續進行我國牛型結核菌實驗室監測。

(一) 持續進行本年實驗室結核菌株鑑定盲樣測試，*M. bovis* 陽性結果

立即回饋本署各區管制中心，進行個案疫情調查。

(二) 進行 313 例抹片陽性痰檢體檢測評估，並進一步比較 LPA

(Line-probe assay)檢測為 MTBC 陽性結果，同時分析抹片價數對

兩方法學的偵測準確性。

結 果

【一】、牛型結核菌快速檢測技術平台於臨床認可實驗室進行評估，供人畜共通傳染病檢驗用。

(一) 預配混合液之品管確認

(1) Precision 測試:

將檢體於一次檢測中進行三重覆測試，檢查重複試驗結果是否一致。結果如圖一所示，選取 *M. tuberculosis*、*M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 各 2 株臨床菌株檢體，於一次反應中，分別進行三重覆試驗，結果顯示 *M. tuberculosis* 出現單一綠色(IS)螢光訊號，*M. bovis* 出現綠色(IS)及藍色(RD4)雙色螢光訊號，*M. bovis* BCG 出現綠(IS)、藍(RD4)、紅(BCG)三色螢光訊號。Precision 測試共完成 2 株 *M. tuberculosis* 臨床菌株，3 株 *M. bovis* 臨床菌株，3 株 *M. bovis* BCG 臨床菌株，4 株 NTM 臨床菌株，另包括 *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG 核酸及陰性對照組各一共 16 件檢體，總共測試 48 次單一反應，測試每一檢體三重覆的結果均一致。

(2) Reproducibility 測試:

將檢體於不同三日進行測試，確認試驗結果是否一致。結果如圖二所示，*M. tuberculosis*、*M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 各 2

株臨床菌株檢體，分別於不同三日進行測試，其結果顯示菌株檢體為 *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG 均得到正確螢光訊號。Reproducibility 測試共完成 16 件包含 2 株 *M. tuberculosis* 臨床菌株，3 株 *M. bovis* 臨床菌株，3 株 *M. bovis* BCG 臨床菌株，4 株 NTM 臨床菌株，另包括 *M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG 核酸及陰性對照組，檢體於不同三日測試結果均一致。

(3) Stability 測試:

將預先配置之試劑混合液儲存於-20℃環境，分別於不同週數取出進行測試，確認試驗結果是否一致。結果如圖三所示，選取 *M. bovis* 1 株臨床菌株檢體及 *M. tuberculosis*、*M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 核酸及陰性對照組共 5 件檢體，分別於第 0、1、2、3、6、8、12、16 週進行測試，其結果顯示各測試檢體均得到正確且一致的螢光訊號。

(二) 快速檢測技術平台於臨床認可實驗室(A)評估

完成品管評估預配混合液後，本年度 9 月於本署 1 分生檢測認可實驗室進行實地測試，於該實驗室選取連續 220 株液態培養陽性菌株為測試組，每次實驗以 8 連排反應管共 6 排為反應樣本數，扣除每次反應 3 管陽性核酸對照組及 1 管陰性對照組，每次

共進行 44 管檢體測試。220 株檢體計分 5 次實驗完成。檢測結果與該實驗室例行 ICT 結果於表一。在總數 220 株檢體中，169 (76.8%)株檢體經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陽性，此批檢體中，並未發現任一例為 *M. bovis* 或 *M. bovis* BCG 陽性結果；另 51 (23.2%)株檢體全經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陰性，進一步分析 51 株菌株鑑定結果，1 株經 GenoType CM 判定為革蘭氏陽性菌，需進一步定序外；另 2 株因檢體核酸品質不佳，無法獲得較佳的 PCR 反應結果，需重新取得菌株樣本再次實驗。其餘 48 株判定為非結核分枝桿菌 (NTM)。NTM 菌株中以 20 株 MAC (9.1%)最多、其次依序為 10 株 *M. fortuitum* (4.5%)、6 株 *M. abscessus* (2.7%)、3 株 *M. scrofulaceum* (1.4%)、*M. gordonae* 及 *M. malmoense* (0.9%)各 2 株、*M. interjectum*、*M. lentiflavum* 及 *M. mucogenicum* 各 1 株(0.5%)，另有 2 株檢體經 GenoType CM 及 AS 僅能判定為分枝桿菌屬，無法進一步確認菌種名稱，定序試驗亦無法獲得正確結果。

【二】、持續進行我國牛型結核菌實驗室監測。

(一) 牛型結核菌實驗室監測

本年度累計至 11 月止，48 例個案菌株進行 MTBC (含 *M. bovis* 及 BCG) 鑑定分析，經由 spoligotyping、GenoType[®] MTBC 等方

法學進行鑑定。再利用此快速檢測技術平台進行盲樣測試，結果顯示 15 株 *M. tuberculosis*、20 株 *M. bovis*、13 株 BCG 經盲樣檢測結果與上述商用方法學結果完全一致(表二)。15 株最終鑑定為 *M. tuberculosis* 結果中，有 9 株檢體係透過病例審查機制要求進行 *M. bovis* 菌株鑑定，該 9 例個案疫調結果自訴均有牛羊畜牧場從業人員經驗，但檢測結果均為 *M. tuberculosis*。

(二) 抹片陽性痰檢體檢測評估

總數313例抹片及培養MTBC陽性的原消化痰檢體，以LPA (line-probe assay)與triplex real-time PCR分別進行檢測，三色螢光快速檢測與LPA檢測陽性結果敏感度分別為97.1% (304/313)與93.6% (293/313) (表三)。分析兩者差異分別在於1件抹片4+檢體，2件抹片2+檢體，8件抹片1+檢體，統計分析P-value，分別為0.395、0.18及0.056，並未具統計上的差異。

304件triplex real-time PCR鑑定為MTBC陽性中，三例共5件檢體檢測結果為*M. bovis*，分別為第一例個案4+檢體(N14-881)，第二例2套檢體均為4+ (N14-1436及N14-1437)，第三例2套檢體分別為3+及4+ (N15-0003及N15-0005)，第一例及第二例個案共3套檢體均有後續培養陽性菌株，鑑定菌株結果均為*M. bovis*，第三例個案2套檢體培養結果為陰性及非MTBC，但該2套痰檢體均

檢測出*M. bovis*陽性反應，我們回溯確認該個案另不同時期陽性培養菌株結果亦屬*M. bovis*。三例個案居住地均在中部地區南投縣(表四)。

討 論

【一】、牛型結核菌快速檢測技術平台於臨床認可實驗室進行評估，供人畜共通傳染病檢驗用。

於圖一、二、三結果得知，在 precision、reproducibility 及試劑 stability 上，不論穩定度及應用時的準確性上，均獲得最佳化的結果。在 precision 檢測時，同一樣本 3 重複的訊號曲線完全重疊即可得知其優秀的檢測品質。在 reproducibility 檢測，不同 3 日配置的試劑，使用同一組測試組亦獲得一致的結果。值得注意的是預配混合液的保存效期相當令人滿意，一般而言，PCR 反應的預配混合液為使用濃度，濃度遠低於原始庫存未稀釋試劑濃度，準則上並不建議長期保存使用，但就評估共 16 週的結果顯示，低濃度形式的混合液並不影響整體的檢測品質，估計保存期或可延長更久的時間使用。

實際於臨床實驗室評估時，由於此項技術仍屬 PCR 形式的實驗，因此在實驗室的選擇及操作人員的評估上，多花費了一至兩個月的時間確認。實地操作時，先由計畫主持人介紹簡易操作流程，並示範 8 連排反應管的使用，之後由該實驗室分生操作人員進行盲樣檢體操作，所有 220 株檢體測室完成後，始與該實驗室原檢體的 ICT 結果相比較。根據操作人員的即時回饋，此項技術加樣及反應步驟簡便易操作，唯一稍嫌繁瑣是使用 8 連排反應管一次僅能進樣 8 個樣本，完成

後各 8 連排管需各自蓋上 8 連排光學蓋，造成些許的不變。此現象早於勘測選擇實驗室時，計畫團隊已發現該實驗室並無適合較大的 96 孔盤式離心機的設備，因此才使用 8 連排反應管(適用桌上型小離心機)進行評估，因此若能使用 96 孔光學反應盤，將可更節省開關蓋的時間，增進操作的效率。另一方面，由於混合反應液的穩定保存因素，日後或許可直接先將反應液預注於 8 連排反應管或 96 孔反應盤中冷凍保存，須檢測時才取出回溫後直接加樣進行檢測，相對步驟將更為簡易。相對地，此項技術仍屬於 PCR 反應項目，因此如何避免操作人員在大量檢體操作時的交互污染及長時間操作時的穩定度，都是此技術運用時需考慮的重大因素。綜上估計，若是操作人員適應相關細節，估計每天上下午至少各進行一次 96 孔盤反應，最大操作檢體量約可達 200 件檢體。本年度計畫名稱及目的係將此快速檢測方法應用評估於臨床端實驗室，結果顯示目前我國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。

在總數 220 株檢體檢測結果顯示，不論是 169 (76.8%)株檢體經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陽性，抑或 51 (23.2%)株全經 ICT 及 triplex real-time PCR 判定為 MTBC 陰性檢體，triplex

real-time PCR 檢測具高專一性，分析敏感度、專一性、陽性預測值及陰性預測值均為 100%。尤其是臨床端自原始消化去污染痰檢體經液態培養的菌株，勢必與各送驗單位完成純化/藥敏試驗的菌株送至本署進行分析的檢體相較，複雜度更高。雖然在此次評估中，並未發現任一 *M. bovis* 或 *M. bovis* BCG 檢測陽性結果，推測主要原因在於該測試實驗室位於北部，結核病例族群多為都市化背景，並不屬於去年計畫評估的中部縣市牛型結核病高風險族群，因此得到上述結果並不意外。

於 51 株檢測為 MTBC 陰性檢體中，20 株(9.1%, 20/220)鑑定為 MAC，由此可得知該實驗室非結核分枝桿菌菌株以此為最主要，與去年計畫結果相較，此技術建立時，評估 4 株 MAC 標準菌株，當時並未直接測試臨床菌株，據此，此項技術評估經標準菌株及臨床菌株測試後，對於非結核分枝桿菌鑑別具高準確性。

【二】、持續進行我國牛型結核菌實驗室監測。

本年度持續分析本年度累計至 11 月止，48 例個案菌株進行 MTBC (含 *M. bovis* 及 BCG) 鑑定分析，經由 spoligotyping、GenoType[®] MTBC 等方法學進行鑑定，獲得 100%的一致性，此結果與去年計畫期末報告相較，去年共進行 40 例個案菌株鑑定，此兩年鑑定的菌株相當，合計共 88 株菌株，含 19 株 *M. tuberculosis*、29 株 *M. bovis* 及

40 株 *M. bovis* BCG，結果與商用試劑檢測結果完全一致。經兩年的評估結果，triplex real-time PCR 技術平台已證實可直接導入實驗室例行鑑別結核菌群(MTBC)鑑定流程。另外值得注意的是，多數 *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。

本年度計畫新增評估臨床抹片陽性消化去污痰檢體，總數 313 例抹片及培養 MTBC 陽性的原消化痰檢體，以 LPA (line-probe assay)與 triplex real-time PCR 分別進行檢測，兩方法檢測陽性結果總數雖略不同，主要差異數目在 1+檢體上，經統計分析 P-value 雖無差異，但 triplex real-time PCR 的檢測似較商用試劑有較高的敏感度。

3 例檢出 *M. bovis* 的個案，抹片價數介於 3-4+之間，所有個案相關菌株經分析均確認為 *M. bovis*，顯示此技術具前端篩選功能，可針對抹片陽性通報結核病個案，提供鑑別診斷。3 例 *M. bovis* 確定個案均有居住地(南投)相同的因素，去年期末報告指出，(1)南投縣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 年南投國姓鄉結核病通報 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。由於本年
度仍持續發現個案，推論此區域仍屬我國牛結核病感染之高風險區。

重要研究成果及具體建議

綜合以上，此 triplex real-time PCR 可作為 MTBC 區別 *M. tuberculosis*、*M. bovis* 及 *M. bovis* BCG 的快速鑑定平台，不論在臨床實驗室的實地評估，抑或實驗室本身例行鑑定上，均可推廣進行實際應用。

M. bovis 實驗室監測系統顯示，檢出為 *M. bovis* 陽性個案中，其中仍有無畜產動物接觸史而遭 *M. bovis* 感染，顯示仍有感染途徑是現行公衛調查上無法釐清的感染來源。此 triplex real-time PCR 診斷平台具有高通量及公衛監測的效果，因成功自 3 例抹片陽性個案中檢出 *M. bovis*，同時又具地緣關聯性，未來的研究應優先強化進行所有可能造成感染途徑的疑似個案及高風險區通報結核病個案的前端痰檢體篩檢，或落實全國性的 *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。

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 Laise, 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.

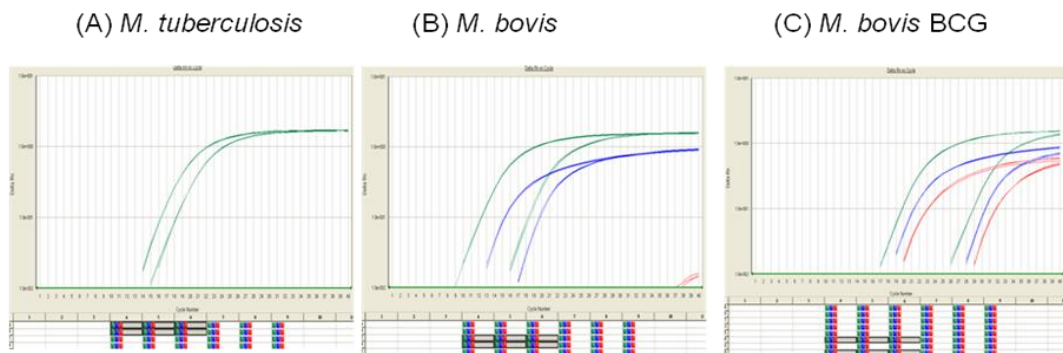
9. WHO Working Group on Zoonotic Tuberculosis, World Health Organization. Veterinary Public Health Unit and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (Mycobacterium bovis)*. Mainz, Germany: World Health Organization; 1995.
10. Mfinanga 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. 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.
22. 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.

23. 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.
24. Cleary TJ, G Roudel, O Casillas and N Miller. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cyclor instrument and a specific fluorogenic probe. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4783-6.

圖、表

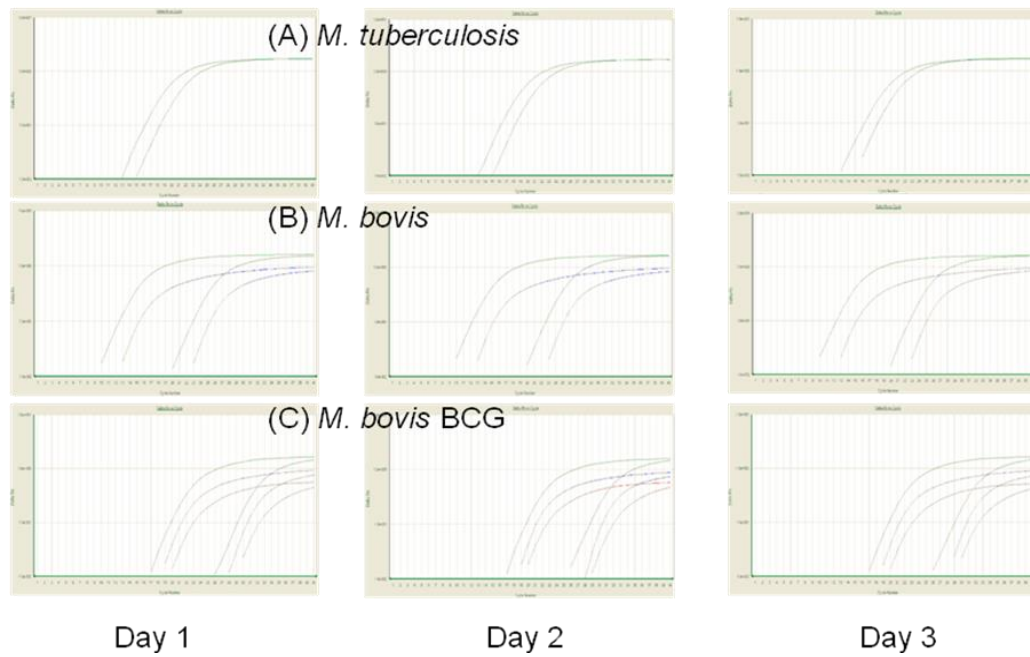
圖一、Precision test



綠線為 FAM (IS)；藍線為 VIC (*M. bovis*-family)；紅線為 NED

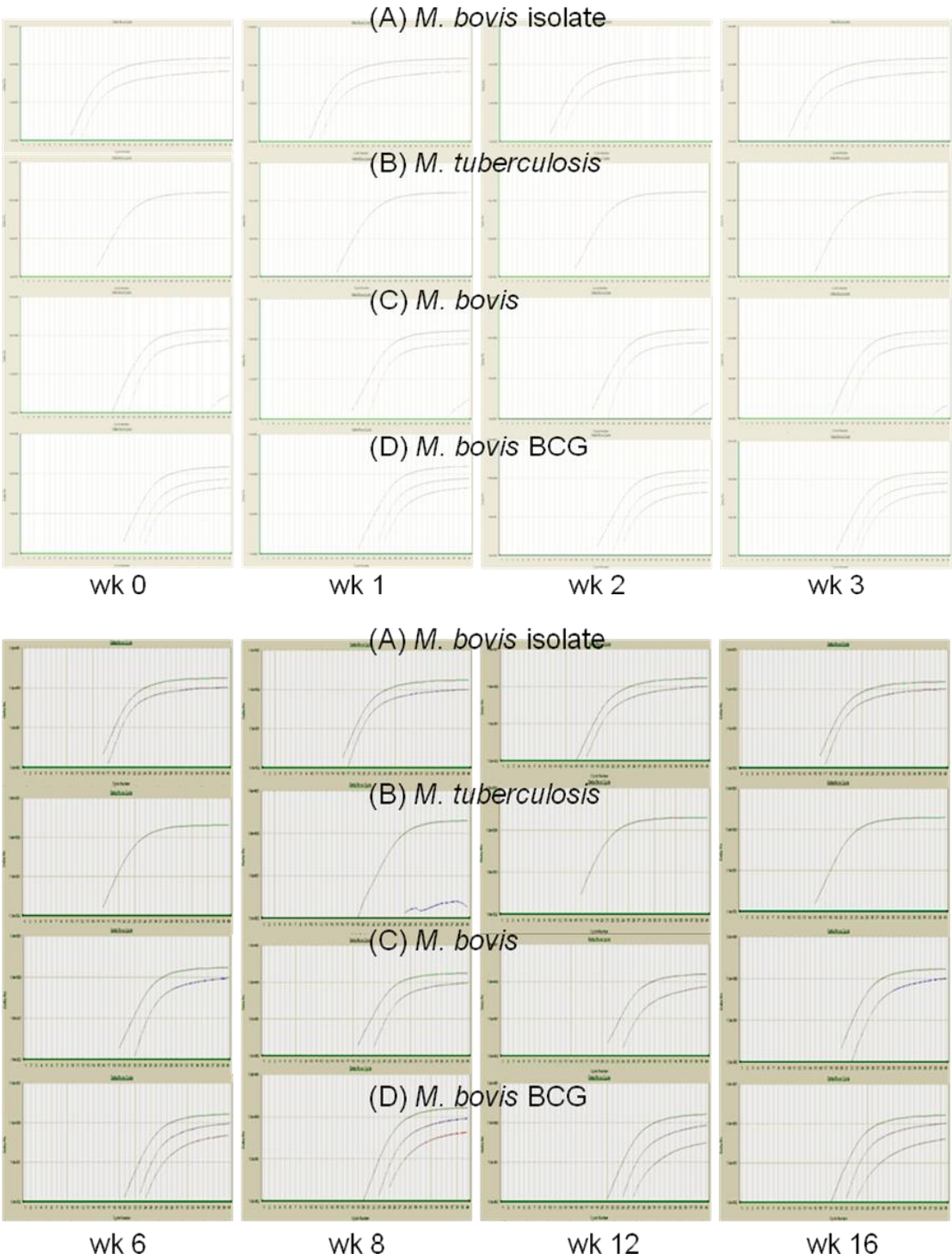
(BCG)。X 軸為 Cycle number (Ct 值)，Y 軸為螢光強度。

圖二、Reproducibility test



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。

圖三、Stability test



表一、臨床實驗室-A 進行 220 株液態培養陽性菌株評估結果

Clinical isolates species identified	Immunochromatographic test (ICT)		triplex real-time PCR	
	Assay (+)	Assay (-)	Assay (+)	Assay (-)
No. MTBC (%)	169 (76.8)		169 (76.8)	
<i>M. tuberculosis</i>			169 (76.8)	
<i>M. bovis</i>			0	
<i>M. bovis</i> BCG			0	
No. Non-MTBC (%)		51 (23.2)		51 (23.2)
MAC		20 (9.1)		20 (9.1)
<i>M. fortuitum</i>		10 (4.5)		10 (4.5)
<i>M. abscessus</i>		6 (2.7)		6 (2.7)
<i>M. scrofulaceum</i>		3 (1.4)		3 (1.4)
<i>M. goodii</i>		2 (0.9)		2 (0.9)
<i>M. malmoense</i>		2 (0.9)		2 (0.9)
<i>M. interjectum</i>		1(0.5)		1(0.5)
<i>M. lentiflavum</i>		1(0.5)		1(0.5)
<i>M. mucogenicum</i>		1(0.5)		1(0.5)
<i>M. spec.</i>		2 (0.9)		2 (0.9)
Gram positive isolate		1(0.5)		1(0.5)
NA*		2 (0.9)		2 (0.9)

* NA, not available

表二、48 株結核菌群菌株鑑定結果(Jan-Nov, 2015)

Identification	No. spoligotyping/LPA	No. triplex real-time PCR
<i>M. tuberculosis</i> *	15	15
<i>M. bovis</i>	20	20
<i>M. bovis</i> BCG	13	13

*, 9 (60%) had dairy history either cattle or sheep through case investigation

表三、313 例抹片及培養 MTBC 陽性以 LPA(line-probe assay)與 triplex real-time PCR 對原消化痰檢體鑑定 MTBC 陽性結果比較

Smear	No. (%)	No. (%) LPA positive	No. (%) real-time PCR positive	P-value
4+	85 (27.2)	84 (26.8)	85 (27.2)	0.395
3+	56 (17.9)	56 (17.9)	56 (17.9)	1.000
2+	62 (19.8)	60 (19.2)	62 (19.8)	0.180
1+	95 (30.4)	81 (25.9)	89 (28.4)	0.056
Sc	15 (4.8)	12 (3.8)	12 (3.8)	1.000
Total	313 (100)	293 (93.6)	304 (97.1)	

表四、3 例痰檢體以 triplex real-time PCR 檢出 *M. bovis* 結果

Case	location	number	smear	triplex real-time PCR			ID
				IS Ct	RD4 Ct	BCG Ct	
1	Nantou	N14-881	4+	28.19	29.87	undet.	<i>M. bovis</i>
2	Nantou	N14-1436	4+	23.88	26.88	undet.	<i>M. bovis</i>
		N14-1437	4+	27.92	29.86	undet.	
3	Nantou	N15-0003*	3+	26.47	30.02	undet.	<i>M. bovis</i>
		N15-0005*	4+	27.17	30.37	undet.	

* primary culture results are non-MTBC and negative