

成果報告

計劃編號：DOH 85-TD-007

計劃名稱：台灣地區 *Mycobacterium fortuitum* complex
之生態分布

英文名稱：The study of ecological distribution of
Mycobacterium fortuitum complex in Taiwan.

執行機構：國立台灣大學獸醫學系

計劃主持人：張照夫

執行期限：84 年 7 月 1 日起 至 85 年 6 月 30 日

提要

Mycobacterium fortuitum complex 包括 *M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus*，為潛在性病原(potential pathogen)，可引起人之角膜炎、關節炎、表皮與軟組織化膿，及慢性肺部等疾病。罹患後天免疫不全徵後群(acquired immune deficiency syndrome)之病人亦常受 *M. fortuitum* complex 感染。故 *M. fortuitum* complex 對人類健康具相當威脅性，在公共衛生上亦非常重要，而台灣地區對 *M. fortuitum* complex 之分布則無獻可稽。為瞭解 *M. fortuitum* complex 在台灣之生態分布，採取全島各地區乳牛場之土壤、飲用水、動物糞便進行分枝桿菌之分離。由飲用水、土壤各 60 件和 120 件糞便，總計 240 件檢體，有 111 件分離到 *M. fortuitum* complex，檢出率為 46%。其中以土壤分離率最高，達 72%(43/60)。鑑於乳牛場環境中 *M. fortuitum* complex 的高檢出率，再由野外未耕地採樣分離，*M. fortuitum* complex，分離率僅 12%。由此推論乳牛場環境適合 *M. fortuitum* complex 之生長，亦可能因土壤、水、糞便三者相互污染而造成之高檢出率。由此調查結果發現台灣地區乳牛場普遍有 *M. fortuitum* complex 分布，在公共衛生上須加強防範 *M. fortuitum* complex 由乳牛製品而影響人體健康。

關鍵詞：*Mycobacterium fortuitum* complex，乳牛場，生態分布

SUMMARY

Rapidly growing mycobacteria are a complex group of environmental organisms that cause human disease. *Mycobacterium fortuitum* complex is the most common pathogen in this group, which includes *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*. It could cause keratitis, arthritis, suppurative dermatitis, chronic pulmonary disease, or abscess of soft tissue in human. There is not any information about the ecological distribution of *M. fortuitum* complex in Taiwan. We used dairy cow farms as model to study the ecological distribution of *M. fortuitum* complex in Taiwan. Drinking water, soil and animal stool samples were collected from dairy cow farms around the island. One hundred and eleven out of 240 specimens isolated *M. fortuitum* complex, the isolation rate was 46%. The isolation rates from drinking water, soil and cow stool were 27%, 72% and 43% respectively. The isolation rate collected water and soil specimens from uncultured land was only 12%. The results might be indicated the environmental of dairy cow farms was suitable for *M. fortuitum* complex growing, or there were cross contamination within water, soil and stool. These results showed that *M. fortuitum* complex were a common organism around this island. We must pay more attention in public health.

Keywords: *Mycobacterium fortuitum* complex, dairy cow farm, ecological distribution.

前言

生長緩慢為分枝桿菌的特色之一，培養在固體培養基上需 2 至 3 週始可生長出肉眼可見之菌落。但有一群分枝桿菌只需要 1 週的時間即可長出肉眼可見之菌落，而被稱為快速生長群分枝桿菌(rapidly growing mycobacteria)。此群分枝桿菌普遍存在於環境中，其中的 *Mycobacterium fortuitum*、*M. chelonae*、*M. abscessus* 為潛在性病原(potential pathogen)，可引起人之角膜炎、關節炎、表皮與軟組織化膿，及慢性肺部等疾病。罹患後天免疫不全徵後群(acquired immune deficiency syndrome)之病人亦常受 *M. fortuitum* complex 感染。國外報告 *M. fortuitum* complex 可由自然界之土壤、水、灰塵及不同動物體中分離到[3,12]。故 *M. fortuitum* complex 對人類健康具相當威脅性，在公共衛生上亦非常重要，而台灣地區對 *M. fortuitum* complex 之分布則無獻可稽。本研究室於 1992 年進行台灣地省畜產式驗所新竹分所結核病控制研究時，曾由該分所牧野之飲水、土壤、及結核菌素陽性反應牛隻分離到 12 株 *M. fortuitum* complex[1]。由此得知 *M. fortuitum* complex 亦存在於台灣地區，惟其分布情況不明。本計畫將以乳牛場為模式來研究台灣地區 *M. fortuitum* complex 的生態分布。

材料與方法

為研究 *M. fortuitum* complex 在台灣之生態分佈，將台灣全島依北、中、南、東部分四區採樣，以乳牛場為採樣點，進行環境土壤、飲用水及動物糞便採樣。採樣方式以場為單位，以各區總場數之 1/8 為採樣場數，即全島共 920 場，欲採樣場數 114 場。每場採土壤、飲用水檢體各一件及糞便二件。土壤及糞便加滅菌水使均質化後，離心去上清液。沉澱物加入 4%NaOH 混合均勻後放置 1 小時以去除雜菌後，以 2N HCl 中和鹼。沉澱物再加 0.2% Malachite green 作用 30 分鐘，最後離心去上清，以無菌棉花棒沾取沉澱物接種於 Middlebrook 7H10 medium 及 Lowenstein-Jensen slant，培養於含 5%CO₂ 之 37℃ 培養箱，觀察 6 週。水檢體則參照 Von Reyn[12] 之法，將水離心去上方液體，剩下約 1mL 液體，從中取 0.1mL 液體塗抹於 Tsukamura minimal-Tween 80-cycloheximide agar medium，培養於 37℃ 培養箱，觀察 6 週。長出之菌落以抗酸染色確定其為抗酸菌，快速生長群分枝桿菌在初態培養時常出現生長緩慢的現象，生長速度以次培養的結果為依據，篩出生長速度在 7 天之內的抗酸菌，再依據 Roberts 及 Payeur [6,8] 之法做菌種鑑定(表 1)。

研究結果

自 1995 年 10 月至 1996 年 7 月間，已在全島 60 處乳牛場進行採樣，尚有 54 場未採。已採樣的 60 場為北部 10 場、中部 2 場、南部 45 場、東部 3 場，共計採得飲用水、土壤檢體 60 件，糞便檢體 120 件。從中分離到 118 株 *M. fortuitum* complex，其中以土壤分離率最高 (72%)。因有些檢體可分離到不止一種之 *M. fortuitum* complex，故檢出 118 株 *M. fortuitum* complex 而陽性檢出數只有 111 個檢體，總陽性檢出率 46% (111/240)。全島四區乳牛場的 *M. fortuitum* complex 陽性檢出率分別為北部 45%、中部 75%、南部 45%、東部 50% (表 2)。各區不同菌種的分離情形，皆以 *M. fortuitum* biovar

fortuitum 為主，*M. chelonae* 次之；南部地區另有分離到 *M. fortuitum* biovar *peregrinum* 與 *M. fortuitum* third biovariant，為其它地區所未分離到之菌種(表 3)。118 株 *M. fortuitum* complex 分別為，*M. fortuitum* biovar *fortuitum* 56 株、*M. fortuitum* biovar *peregrinum* 8 株、*M. fortuitum* third biovariant 29 株、*M. chelonae* 18 株、*M. abscessus* 7 株。比較不同檢體的分離情形，仍以 *M. fortuitum* biovar *fortuitum* 分離率最高(表 4)。除 *M. fortuitum* complex 外，亦分離到 6 株非 *M. fortuitum* complex 之快速生長群分枝桿菌及 16 株非快速生長群之分枝桿菌，主要為 *M. avium* complex。

討論

就目前以採樣之 60 場的分離結果來看，全島四區乳牛場的 *M. fortuitum* complex 陽性檢出率分別為北部 45%、中部 75%、南部 45%、東部 50%，乍看之下中部似乎有最高的分離率，但因其採樣場數只有 2 場不足以為代表。若只比較北、南、東部三區之分離率則無顯著差異，故 *M. fortuitum* complex 的分布因無地域上的差異。獨有南部地區分離到 *M. fortuitum* biovar *peregrinum* 與 *M. fortuitum* third biovariant，而其它地區則未分離到，這可能是此 2 種菌種的分布有地域上的差異，但須待採樣工作完全完成後始能斷言。鑑於乳牛場環境中 *M. fortuitum* complex 的高檢出率(46%)，再由四處野外未耕地採集水與土壤進行分離，只分離到一株 *M. fortuitum* biovar *fortuitum*，分離率 12%(1/8)。由此推論可能是乳牛場環境適合 *M. fortuitum* complex 之生長，但亦不排除土壤、水、糞便三者相互污染而造成之高檢出率。對此將應用 pulsed-field gel electrophoresis 來得知同場不同檢體來源的 *M. fortuitum* complex 是否相同，與比較不同地區之 *M. fortuitum* complex 的差異。菌種鑑定方面，先以生長速度篩出快速生長群分枝桿菌，再作生化鑑定進一步區分各菌種，目前用於鑑定分枝桿菌的方法有 104 種之多，我們只選用較具代表性的 10 種生化性狀來做鑑定。但由於 *M. fortuitum* complex 在生化性狀上的多變，常造成判讀上的困難。故若單以生化鑑定結果來鑑定菌種

易有疏失，必須再以核酸技術鑑定法輔助之，可能採用的方法為以 PCR 增幅 65KD 熱休克蛋白的基因片段後，再以限制酶切割此 PCR 產物，最後以其限制酶切割圖譜之不同做菌種鑑定[11]。

結論與建議

由以上初步結果顯示乳牛場環境可能適合 *M. fortuitum* complex 之生長，故全省乳牛場 *M. fortuitum* complex 的生態分布可能並不足以代表 *M. fortuitum* complex 在台灣地區的生態分布，只能推論台灣地區的確存在 *M. fortuitum* complex。若欲研究 *M. fortuitum* complex 的生態分布，則須將台灣地區依不同地質、不同氣候來分區調查。由此調查結果發現台灣地區乳牛場普遍有 *M. fortuitum* complex 分布，在公共衛生上須加強防範 *M. fortuitum* complex 由乳牛製品而影響人體健康。另外，乳牛場環境中 *M. fortuitum* complex 的高檢出率，亦可能解釋近年來牛隻結核菌素檢測偽陽性率偏高的原因。國外常有 *M. fortuitum* complex 感染的病例報告[2,4,5]，而台灣地區則無，這不表示沒有，只是台灣醫療單位檢測的重點皆在生長緩慢的結核桿菌，而將分離到的快速生長群分枝桿菌視為污染而棄之，以致顯示台灣地區無 *M. fortuitum* complex 感染病例的假像，希望有關單位對此問題能重視之。

表 1 *M. fortuitum* complex 中各菌種之主要鑑定項目

Organism	Test								
	Pigment	Arylsul- fatase,3 days	Mac-	Nitrate	Tolerance	Ion uptake	Growth on:		
			Conkey agar w/o crystal violet	reduction	to 5%NaCl		Sodium citrate	Manni- tol	Inositol
<i>M. fortuitum</i> biovar									
<i>fortuitum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>peregrinum</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-
third-biovariant	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>M. chelonae</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>M. abscessus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-

表 2 台灣地區北、中、南、東部 60 處乳牛場環境及乳牛糞便中 *M. fortuitum* complex 之分離情形

地區	<i>M. fortuitum</i> complex 檢出率%*			
	飲用水	土壤	糞便	總計
北部 10 場	30 (3/10)	60 (6/10)	45 (9/20)	45 (18/40)
中部 2 場	50 (1/2)	100 (2/2)	75 (3/4)	75 (6/8)
南部 45 場	24 (11/45)	76 (34/45)	40 (36/90)	45 (81/180)
東部 3 場	33 (1/3)	33 (1/3)	66 (4/6)	50 (6/12)
總計	27 (16/60)	72 (43/60)	43 (52/120)	46 (111/240)

* (陽性數 / 檢體數)

表 3 *M. fortuitum* complex 不同菌種在不同地區之分離情形

菌種	地區 (檢出數/檢體數)			
	北部(13/40)	中部(7/ 8)	南部(92/180)	東部(6/12)
<i>M. fortuitum</i> biovar				
<i>fortuitum</i>	5	4	44	3
<i>peregrinum</i>	0	0	8	0
third biovariant	0	0	27	2
<i>M. chelonae</i>	3	3	11	1
<i>M. abscessus</i>	5	0	2	0

表 4 *M. fortuitum* complex 不同菌種在不同檢體中之分離情形

菌種	飲用水	土壤	糞便	分離率 *
<i>M. fortuitum</i> biovar				
<i>fortuitum</i>	9	23	24	23 (56/240)
<i>peregrinum</i>	0	5	3	3 (8/240)
third biovariant	4	16	9	12 (29/240)
<i>M. chelonae</i>	2	6	10	8 (18/240)
<i>M. abscessus</i>	0	3	4	3 (7/240)

* (檢出數/檢體數)

參考文獻

1. 余珍芳、張照夫。結核菌素反應陽性乳牛牧場結核病病原探討。中華獸醫誌(審理中), 1994.
2. Burns DN, Wallace RJ, Schultz ME, Zhang Y, Zubairi SQ, Pang Y, Gibert CL, Brown BA, Noel ES, Gordin FM. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Rev Respir Dis.* 144: 1153-1159, 1991.
3. Goslee S, Wolinsky E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 113: 287-292, 1976.
4. Griffith DE, Girard WM, Wallace Jr RJ. Clinical features of pulmonary disease cause by rapidly growing mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 147: 1271-1278, 1993.
5. Hosker HSR, Lam CW, Ng TK, Ma HK, Chan SL. The prevalence and clinical significance of pulmonary infection due to non-tuberculous mycobacteria in Hong Kong. *Respir Medicine.* 89: 3-8, 1995.
6. Payeur JB. Laboratory method in veterinary microbiology. National veterinary Severice Lab, USDA, 1993.
7. Pitulle C, Dorsch M, Kazda J, Wolters J, Stackebrandt E. Phylogeny of rapidly growing membes of the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* 42:337-343, 1992.
8. Robert GD, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. In Balow A et al (eds) *Manual of cilical microbiology* 5th ed. American Society or Microbiology, USA. 304-347, 1991.
9. Silcox VA, Good RC, Floyd MM. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 14: 686-691, 1981.
10. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of *Mycobacteia*: molecula ersus phenotypic metods. *J Clin Microbiol.* 34: 296-303, 1996.
11. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace Jr RJ. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence of taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 33:149-153,1995.
12. Von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW, Brindle RJ, Gilks CF, Lumio J, Lâhdevirt J, Ranki A, Dason D, Flkinham III JO. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zie, and Kenya. *J Clin Microbiol.* 31: 3227-3230, 1993.
13. Wallance Jr. RJ. Recent changes in taxonomy and diseae manifestations of the rapidly growing *Mycobactera*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13: 953-960, 1994.