

皮內結核菌素試驗陽性牛隻之分枝桿菌分離結果分析 (2022 - 2024 年)

黃春申*、林育如

農業部獸醫研究所

摘要 牛結核病 (bovine tuberculosis, bTB) 是我國乙類動物傳染病，也是重要人畜共通傳染病，主要由牛分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*) 感染所造成，牛、鹿為主要宿主。近年農業部動植物防疫檢疫署推行「牛結核病防疫行動方案」，本所配合進行皮內結核菌素試驗 (intradermal tuberculin test, ITT) 陽性牛隻之病原培養與鑑定。本研究為探討 ITT 陽性牛隻之肉眼病變和牛分枝桿菌分離情形，對 2022 - 2024 年動物防疫機關採樣送檢之咽背淋巴結以及部分胸腔淋巴結與肺臟，於切面觀察肉眼病變後進行培養與鑑定，結果總數 1,055 頭牛隻中，403 頭 (38.2%) *M. bovis* 分離陽性。前述 1,055 頭牛隻中，361 頭 (34.2%) 之淋巴結 (或肺臟) 具肉眼可見病灶。顯示檢體病原分離陽性率以及檢體有病灶之機率皆不高，可能是由於 ITT 可檢出早期感染之動物。當一旦形成肉眼病灶，病原分離率為 94.2% (340/361)。

關鍵詞：牛結核病、牛分枝桿菌、皮內結核菌素試驗

緒言

牛結核病 (bovine tuberculosis, bTB) 是我國乙類動物傳染病，也是重要人畜共通傳染病，主要由牛分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*) 感染所造成，牛、鹿為主要宿主。感染途徑主要為吸入，感染後會於頭胸部淋巴結或肺臟產生病灶，若為食入感染，則會於消化道淋巴結或腹腔臟器產生病灶。病灶隨病程演進後會形成乾酪性壞死 (caseous necrosis)、鈣化病灶 (calcified) 或肉芽腫 (granuloma) 等典型的特徵性結節 (tubercles)。皮內結核菌素試驗 (intradermal tuberculin test, ITT) 是國際間貿易用的標準牛結核病檢驗方法，也是我國標準檢測方法。ITT 原理是基於延遲型過敏反應，不適用於早期感染 (感染 3-6 週內) 或感染末期免疫抑制之動物。以 ITT 篩檢撲殺作為牛結核病撲滅

計畫之國家，由於 ITT 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 [4]。臺灣自民國 45 年起以 ITT 進行乳牛檢測，陽性牛隻一律撲殺，但直至目前臺灣仍未完全清除本病，近年動植物防疫檢疫署推行「牛結核病防疫行動方案」，獸醫研究所配合進行病原鑑定，故此研究將以 ITT 陽性動物病原分離鑑定之結果分析牛結核病感染場，試圖解析本病在臺灣檢驗之困境。

材料及方法

材料來源

配合動物防疫機關人員進行乳牛 ITT 檢驗，檢驗結果為陽性之動物採樣其頭胸部淋巴結，主要採集咽背淋巴結，若情況許可，再採集胸腔內之肺門淋巴結、

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

縱膈淋巴結或肺臟，並將樣品寄至獸醫研究所細菌室進行分枝桿菌的培養、核酸萃取及其他分生相關試驗。

分枝桿菌分離與培養

ITT 陽性檢體進行分枝桿菌之分離與培養，使用傳統的 LJ medium (Löwenstein-Jensen medium，啟新生物科技，臺灣)，包括 LJ 不含甘油 medium 2 支與 LJ medium 1 支，併用市售液體培養系統 (MGIT™ 960 tube 1 管)，以增加分離率 [1]。接種後三週起，每週觀察是否有菌落生長，持續觀察 12 至 14 週。

核酸萃取

LJ medium 上生長之菌落混於 0.2 mL 之無菌水或 MGIT™ 培養液以 99°C 加熱 10 分鐘處理後，10,000 rpm 離心 1 分鐘，上清液即可進行核酸萃取及後續分生試驗。

Real-time PCR (qPCR) 檢測

Real-time PCR 為利用 LightCycler 96 Instrument (Roche Diagnostics, Germany)，使用 2 組引子與探針，一為依據結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) IS6110 設計之引子 (IS6110-forward: 5'-GGTAGCAGACCTCACCTATGTGT-3'; IS6110-reverse: 5'-AGGCGTCGGTGACAAAGG-3') 及探針 (IS6110-probe: 5'-FAM-CACGTAGGCGAACCC-MGBNFQ-3') [3]。第二組為依據牛分枝桿菌 (*M. bovis*) *lpqT* 基因 (功能為編碼成一種保守的脂蛋白) 設計之引子 (*lpqT*_FW: 5'-ACGAATCCGGCGATGATC-3'; *lpqT*_RV: 5'-CGACTGCACACCTGGAA-3') 及探針 (*lpqT* Probe: 5'-FAM-TTGGCCGGCGCCGGTT-BHQ1-3') [2]。

兩項反應液與反應條件相同，反應液為含 (2x) 預混反應試劑 (Kapa Probe Fast Universal, Kapa Biosystems, South Africa) 12.5 µL、20 µM 正向及反向引子各 0.375 µL 與 50 µM 探針 0.1 µL、5 µL DNA，加水至總體積 25 µL。反應條件為 95°C 5 分鐘後進行 45 個循環之 95°C 15 秒、60°C 30 秒，兩項

Ct 結果皆小於 35 即判定為牛分枝桿菌陽性。

結果

統計臺灣 2022 年至 2024 年牛結核病陽性場送檢之 ITT 陽性牛隻檢驗結果 (表 1)，總數 1,055 頭牛隻中，403 頭 (38.2%) *M. bovis* 分離陽性。相同 1,055 頭牛隻檢體中，共有 361 頭 (34.2%) 之檢體具肉眼可見病灶。前述 1,055 頭牛隻送檢皆有採集咽背淋巴結 (共 1,055 件)，其中有 298 件 (298/1055, 28.2%) 有病灶，有病灶的檢體中 278 件 (93.3%) 為 *M. bovis* 分離陽性。其餘胸腔內淋巴結檢體檢驗結果：103 件縱膈淋巴結有 41 件 (41/103, 39.8%) 有病灶，具病灶的檢體中 41 件 *M. bovis* 分離陽性，陽性率 100%；221 件肺門淋巴結中有 16 件 (16/221, 7.2%) 有病灶，具病灶的檢體中 15 件 *M. bovis* 分離陽性，陽性率 93.8%；以及 72 件肺臟中有 6 件 (6/72, 8.3%) 有病灶，具病灶的檢體中 6 件 *M. bovis* 分離陽性，陽性率 100%。另外 1,055 頭牛隻檢體中不具肉眼病灶但 *M. bovis* 分離陽性共有 63 件，陽性率為 9.1% (63/694)。詳細各年度頭數、臟器類型、病灶數及分離陽性數參照表 2。

討論

本研究之檢體來源為現場防疫人員撲殺 ITT 陽性牛隻後採樣，因受撲殺動物數量及現場人力限制，且咽背淋巴結相對胸腔淋巴結採集更為容易，故大部分情況下僅能採得咽背淋巴結，而較專業之採樣人員，會開胸採集胸腔淋巴結 (需要具專業能力) 與肺臟，故每頭牛隻檢體皆含咽背淋巴結，但僅有部分牛隻採得縱膈淋巴結、肺門淋巴結或肺臟。

於本研究中採樣人員甲為資深人員 (負責縣市 C、D、E 之部分採樣)，採樣時受限於人力與為了提高實驗室病原分離率，會對 ITT 陽性牛隻挑選後剖檢，現場採樣時除咽背淋巴結，尚會檢查縱膈淋巴結，其次檢查肺門淋巴結或肺臟。故雖其採集之樣本數占整體比例低，但本研究中大部分分離陽性之縱膈淋巴結皆來自人員甲。推測由於其具較佳的檢查與採樣技術，使得縱膈淋巴結分離陽性率 (39.8%) 較高。而地方防疫人員普遍僅採取咽背淋巴結，雖然近期經驗

與技術已有加強，但前幾年採集之樣本確有部分不良，造成整體咽背淋巴結分離陽性率 (26.4%) 較縱膈淋巴結分離率低。而另一位主要採樣人員乙負責縣市 F、G、H 之採樣，共採樣 558 頭牛隻，超過整體一半，對本研究數據影響大，由於其人力較為充足，故針對每頭 ITT 陽性動物，除咽背淋巴結外，並儘量採集肺門淋巴結、肺臟或縱膈淋巴結，是本研究中肺門淋巴結及肺臟檢體之主要來源，也是縱膈淋巴結部分來源。本研究中肺門淋巴結及肺臟分離陽性率，分別為 6.8% 及 8.3%，較整體分離率低，原因仍需探討。

本研究所謂肉眼可見病變為實驗室生物安全櫃中剪開組織臟器時，可以見到明顯的典型結節病灶 (大多為乾酪性壞死病灶)。病灶有時很小 (2 mm 或更小)，可能與 ITT 可篩檢出早期感染階段之動物，病灶初期形成有關。於實驗室操作病原分離檢驗時，若有肉眼病變之檢體，會優先單獨進行分離及培養。若無法見到肉眼病變時，則會將同牛隻各組織混合檢驗，若此時檢出 *M. bovis* 便會統計至檢體無病灶但 *M. bovis* 分離陽性數中。63 頭牛隻 (9.1%) 實驗紀錄雖標示為無病灶，但仍分離得 *M. bovis*。另外，ITT 陽性牛無病灶或病原分離陰性之原因，除前述感染早期外，尚需考慮其他分枝桿菌感染之干擾 (如副結核病)，但於本研究中並無調查。

若以各縣市送檢數量統計及病原分離陽性率討論 (圖 1、2)，送檢數量由多至少依序為 G 縣市 323 頭、B 縣市 210 頭、C 縣市 131 頭、H 縣市 125 頭、F 縣市 110 頭、E 縣市 76 頭、A 縣市 74 頭及 D 縣市 6 頭。縣市 G 與縣市 B 合計超過總送檢量一半，分別為 30.6% (323/1,055) 及 19.9% (210/1,055)。以分離陽性率討論，各縣市分離率介於 21.4–85.5%。送檢檢體 *M. bovis* 分離率最高為 E 縣市，達 85.5%。縣市 G 與 B 合計占超過一半檢體，分離率為 32–34%。分離率最低為縣市 A 及 C，約為 21–22%。現場防疫人員囿於人力與經驗，無法採檢所有 ITT 陽性牛，且所採其餘樣本也不盡相同，故造成各縣市送檢數量與分離率差異頗大，但總體而言仍約有 38.2% ITT 陽性動物病原分離陽性。

現場執行皮內結核菌素試驗時，首重檢驗人員操作能力，正確施打藥劑、判讀與準確檢出陽性動物對

於本病防治極為重要。因此執行牛結核病檢驗公職獸醫師，務必完成 ITT 檢驗教育訓練，以及每年回訓 1 至 2 次。此外本病為人畜共通傳染病，應該留意個人生物安全防護，避免傷口接觸或吸入病原而感染。

表 1、2022-2024 年臺灣 ITT 陽性牛隻牛分枝桿菌 (*M. bovis*) 分離結果統計。

牛隻 總數	<i>M. bovis</i> 分離陽性數 (%)	送檢之淋巴結 或臟器數 ^a	<i>M. bovis</i> 分離陽性數 ^b (%)	檢體有病灶數	檢體有病灶 <i>M. bovis</i> 分離陽性之 百分比	檢體無病灶，但 <i>M. bovis</i> 分離陽性之 百分比 ^b
1,055	403 (403/1,055, 38.2%)	1,055 (咽背淋巴結)	278 (278/1055, 26.4%)	298	93.3% (278/298)	
		103 (縱膈淋巴結)	41 (41/103, 39.8%)	41	100% (41/41)	9.1% (63/694)
		221 (肺門淋巴結)	15 (15/221, 6.8%)	16	93.8% (15/16)	
		72 (肺臟)	6 (6/72, 8.3%)	6	100% (6/6)	
				361 (361/1,055, 34.2%)	94.2% (340/361)	

* a：牛隻送檢，咽背淋巴結為必採項目，其餘縱膈淋巴結、肺門淋巴結或肺臟則為採檢人員選擇性採樣。

* b：此處僅計算檢體有病灶且同時 *M. bovis* 分離陽性數，是由於病原分離時，若無法見到肉眼病灶，會將同牛隻各組織混合檢驗，故無法分辨出 *M. bovis* 分離自何處，會統計至檢體無病灶但 *M. bovis* 分離陽性數中。

表 2、2022-2024 年各年度臺灣 ITT 陽性牛隻牛分枝桿菌 (*M. bovis*) 分離結果統計。

年度	牛隻 總數	<i>M. bovis</i> 分離 陽性數 (%)	送檢之淋巴結 或臟器數 ^a	<i>M. bovis</i> 分離 陽性數 ^b (%)	檢體 有病灶數	檢體有病灶 <i>M. bovis</i> 分離陽性之 百分比	檢體無病灶，但 <i>M. bovis</i> 分離陽性之 百分比 ^b
2022	201	79 (79/201, 39.3%)	201 (咽背淋巴結)	48 (48/201, 23.9%)	55	87.3% (48/55)	
			50 (縱膈淋巴結)	22 (22/50, 44%)	22	100% (22/22)	7.3%
			12 (肺門淋巴結)	0 (0/12, 0%)	1	0% (0/1)	(9/123)
			18 (肺臟)	0 (0/18, 0%)	0	- (0/0)	
2023	361	143 (143/361, 39.6%)	361 (咽背淋巴結)	97 (97/361, 26.9%)	103	94.2% (97/103)	
			35 (縱膈淋巴結)	15 (15/35, 42.9%)	15	100% (15/15)	8.2%
			105 (肺門淋巴結)	9 (9/105, 8.6%)	9	100% (9/9)	(19/231)
			40 (肺臟)	3 (3/40, 7.5%)	3	100% (3/3)	
2024	493	181 (181/493, 36.7%)	493 (咽背淋巴結)	133 (133/493, 27%)	140	95% (133/140)	
			18 (縱膈淋巴結)	4 (4/18, 22.2%)	4	100% (4/4)	10.3%
			104 (肺門淋巴結)	6 (6/104, 5.8%)	6	100% (6/6)	(35/340)
			14 (肺臟)	3 (3/14, 21.4%)	3	100% (3/3)	

* a：牛隻送檢，咽背淋巴結為必採項目，其餘縱膈淋巴結、肺門淋巴結或肺臟則為採檢人員選擇性採樣。

* b：此處僅計算檢體有病灶且同時 *M. bovis* 分離陽性數，是由於病原分離時，若無法見到肉眼病灶，會將同牛隻各組織混合檢驗，故無法分辨出 *M. bovis* 分離自何處，會統計至檢體無病灶但 *M. bovis* 分離陽性數中。

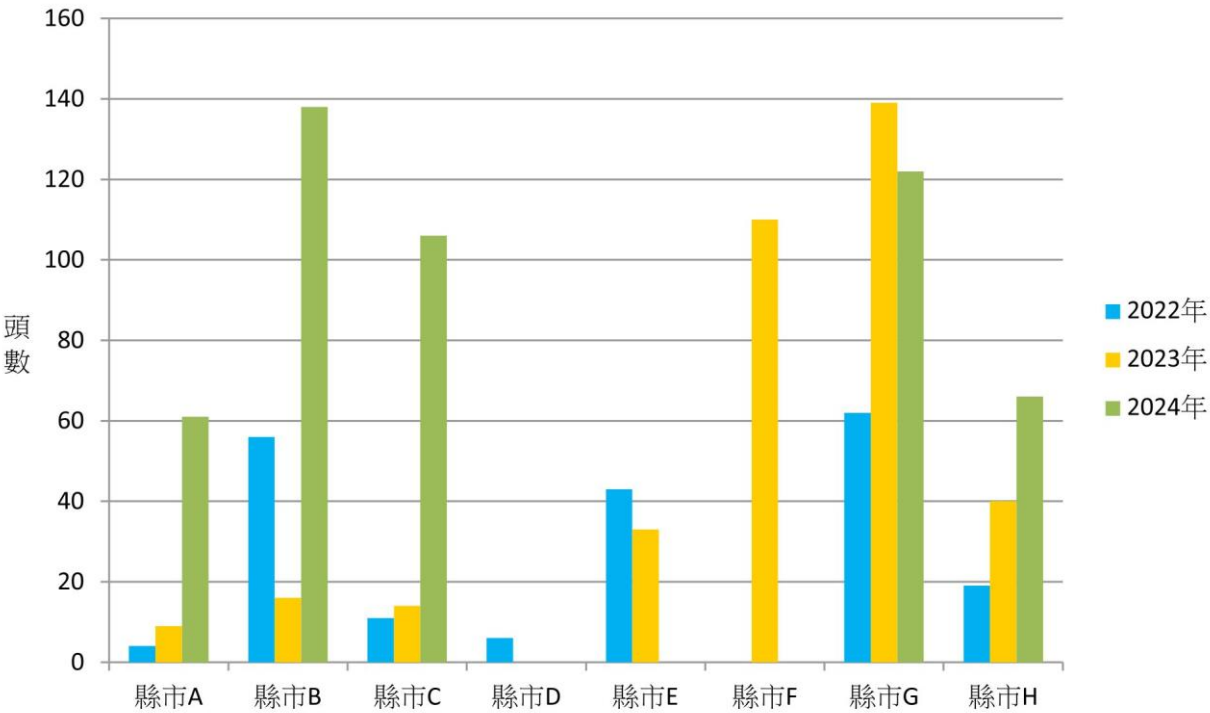


圖 1、各縣市 2022-2024 年送檢 ITT 陽性動物數。
(本圖僅代表各縣市送檢至本實驗室之 ITT 陽性動物數，不代表各縣市 ITT 陽性動物總數。)

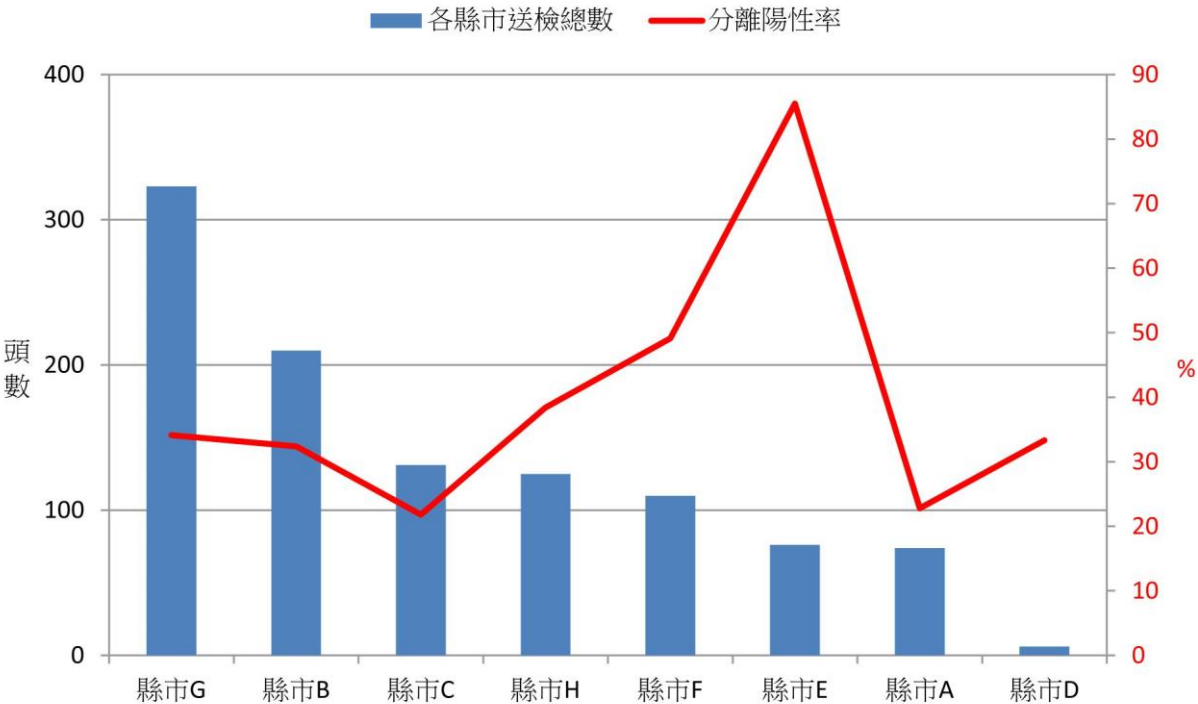


圖 2、各縣市 2022-2024 年送檢 ITT 陽性動物總數及平均分離陽性率。
(本圖僅代表各縣市送檢至本實驗室之 ITT 陽性動物數，不代表各縣市 ITT 陽性動物總數。)

參考文獻

1. 疾病管制署。結核菌檢驗手冊。2012。
2. Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. PLoS ONE, 6:e23481, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023481
3. Sánchez-Carvajal JM, Galán-Relaño Á, Ruedas-Torres I, Jurado-Martos F, Larenas-Muñoz F, Vera E, Gómez-Gascón L, Cardoso-Toset F, Magdalena I, Rodríguez-Gómez, Maldonado A, Carrasco L, Tarradas C, Gómez-Laguna J, Luque I. Real-time PCR validation for Mycobacterium tuberculosis complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes. Front Vet Sci, 8:643111, 2021. doi.org/10.3389/fvets.2021.643111
4. WOA. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. CHAPTER 3.1.13. MAMMALIAN TUBERCULOSIS (INFECTION WITH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX). 2022.

Analysis of mycobacterial isolation results from intradermal tuberculin test-positive cattle (2022-2024)

CS Huang*, YJ Lin

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract Bovine tuberculosis (bTB) is a Category B animal infectious disease in Taiwan and an important zoonotic disease, primarily caused by infection with *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Cattle and deer serve as the main hosts. In recent years, the Animal and Plant Health Inspection Agency has implemented the “Bovine Tuberculosis Control Program,” under which our institute conducts pathogen isolation and identification from cattle testing positive in the intradermal tuberculin test (ITT). This study aimed to investigate the gross lesions and *M. bovis* isolation results from ITT-positive cattle. From 2022 to 2024, retropharyngeal lymph nodes, selected thoracic lymph nodes, and lungs were collected by local animal disease inspection agency for examination. After observation of gross lesions on section, samples were cultured and identified. Among the 1,055 cattle examined, 403 (38.2%) tested positive for *M. bovis* isolation. Of the same 1,055 cattle, 361 (34.2%) had visible gross lesions in lymph nodes or lungs. These findings suggest that both the culture-positive rate and the presence of gross lesions were relatively low, likely due to ITT detecting animals at an early-stage of infection. However, once gross lesions were present, the culture-positive rate was 94.2% (340/361).

Keywords: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Intradermal tuberculin test

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture