

應用細胞培養法快速分離分枝桿菌

林敬覆* 蘇杰夫 吳義興 張惟茗 蕭終融

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

分別以 Lowenstein-Jensen Medium (L-J M) 斜面培養基及 Marc-145 細胞培養對結核菌素 (PPD) 陽性反應陽性牛、羊及鹿之臟器淋巴組織進行核分枝桿菌之分離。631 頭牛，175 頭鹿及 88 頭羊之病材中，分別分離出 391 株牛型分枝桿菌及 10 株鳥型分枝桿菌，其餘者仍繼續觀察中。次將本所分離所得之牛型分枝桿菌 (*M. bovis-YL*) 株分別於 L-J M 及 Marc-145 繼代至第九代，由培養於 L-J M 之菌落中鈎取本菌，以 Dubos' Broth 10 倍階稀釋法稀釋至 10^{-10} 階，將各階稀釋液分別接種於 L-J M (10 μ L/支) 及培養於載玻培養皿 (2-well Chamber slide) 內之 Marc-145 (10 μ L/孔) 後，再將接種後所餘之各階稀釋液再分別以酸鹼處理各 30 分鐘，再依上述步驟接種，進行試驗比較，結果發現未加酸鹼處理者，在接種於 L-J M 之 10^{-7} (4.9 CFU/10 μ L) 階便能鏡檢出，但經酸鹼處理者，則需在 10^{-6} (6.5 CFU/10 μ L) 階才能鏡檢出。

關鍵字：牛型分枝桿菌(*mycobacterium bovis*)，鳥型分枝桿菌(*mycobacterium avium complex*)

緒言

本病為一慢性疾病且為人畜重要共通傳染病之一種細菌性疾病，故於防制措施之制定至為重要，鑑於以往以傳統之斜面培養基 (L-J M) 分離分枝桿菌需時 5 至 14 週^(2,7)，今為縮短其分離時間，以提升診斷品質及時效，而自行研發改良以組織培養分離本菌^(3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13)，以與 L-J M 斜面培養基分離本菌之結果，加以分析比較，以供防制措施制定時之參考。同時為瞭解經多代繼代培養後，是否會引起其他生化性狀改變，亦為探討之範圍。今就本年度計畫所使用之方法、材料及結果等，分述於下。

材料及方法

分離本菌之方法，依林等報告⁽¹⁾方法實施，即將判定為結核菌素陽性反應牛隻、鹿及羊之淋巴組織，經酸鹼處理後分別接種於 L-J M 及 Marc-15 進行分枝桿菌分離本菌，並比較其結果。

次將本所分離所得之牛型分枝桿菌 (*M.*

bovis-YL) 株分別於 L-J M 及 Marc-145 細胞株繼代至第九代時，由培養於 L-J M 之菌落中鈎取本菌，以 Dubos' Broth 為稀釋液，行 10 倍階稀釋法稀釋至 10^{-10} 階，然後將各階稀釋液分別接種於 L-J M 各 4 支 (10 μ L/支) 及培養於載玻培養皿內之 Marc-145 各二片 (10 μ L/孔) 後，放入 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱內培養，再將接種後所餘之各階稀釋液分別以酸鹼處理各 30 分鐘，再依上述接種步驟進行試驗比較。均於接種後第 1 天起檢測有無污染及其增殖情形。

接種於 L-J M 者在接種後第 1 天起除觀察有無污染外並紀錄其結果，直至第 14 週。至於接種於 Marc-145 者，則於接種後第 7 天，先取 1 片接種 10^{-4} 之階稀釋液於 Marc-145 之 Chamber Slide，經固定、抗酸菌染色及鏡檢，以瞭解其增殖情形，至第 14 天將接種 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 各階稀釋液之 Chamber Slide 同時進行固定、抗酸菌染色及鏡檢，其結果與接種於 L-J M 之增殖情形比較。

結果

* 抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

由撲殺之陽性牛 631 頭 (261/631)、鹿 175 頭 (102/175) 及羊 88 頭 (28/88) 中，共計分離出 391 株牛型分枝桿菌，並由撲殺之陽性鹿 175 頭中分離出 10 株鳥型分枝桿菌。詳如表 1。

分離株分別於 L-J M 及 Marc-145 繼代至第 9 代時，由培養於 L-J M 之菌落中鈎取本菌，經上述方法進行試驗結果發現不論是加酸鹼處理者或未加酸鹼處理者於接種第 10^{-8} 及 10^{-9} 階稀釋液之 4 支 L-J M 中均可發現 1 或 2 支內有一個菌落。而在接種於 Marc-145 細胞株未加酸鹼處理者，則須在接種於 L-J M 細胞株之第 10^{-7} (4.9CFU/10 μ L) 階之同階稀釋液即可能鏡檢出本菌，而加酸鹼處理者，則須在接種於 Slant 之第 10^{-6} (6.5CFU/10 μ L) 階之同階者才能鏡檢出本菌。

表 1 結核菌素陽性反應動物於 L-J M 及 Marc-145 分離法之比較

動物種類	測試頭數	分離菌株數		分枝桿菌種類
		L-J M	Marc-145	
乳牛	631	261	253	<i>M. bovis</i>
鹿	175	102	93	<i>M. bovis</i>
乳羊	88	28	23	<i>M. bovis</i>
鹿	175	10	8	<i>M. avium complex</i>

討論

以 L-J M 及 Marc-145 細胞株分離本菌所得之菌株數結果分析，發現以 L-J M 分離者較以 Marc-145 分離者為多(如表 1)，此與本菌經多次繼代後，分別在 L-J M 及 Marc-145 增殖情形之試驗結果頗為相符。

本菌經多次繼代後，分別在 L-J M 及 Marc-145 細胞株增殖情形之試驗所得結果，(一)本菌接種量須在 4.9CFU/10 μ l 或以上才能在 Marc-145 增殖發育。(二)本菌於酸鹼處理過程中約有 87%之死亡，此結果與文獻報告約有 90%之死亡率，頗為吻合。

我國至今對 PPD 皮內注射檢測，判定呈陽性反應之牛隻、羊及鹿等，仍採撲殺、

剖檢、採材、結核分枝桿菌病原分離之一貫過程，其間所造成之污染程度，實在是無法估計，況且如今我國酪農之專業知識已達相當水準，已少有以為誤殺之誤會爭執發生，故除新感染場之陽性反應牛外，應採全數撲殺、剖檢、採材並進行病原分離，以瞭解其流行病學概況，進而控制疫情以免擴大感染外，如原為污染場應免除此一作業過程，如此不但可避免處理結核分枝桿菌陽性反應牛隻、羊及鹿等處理之困擾，同時亦可將因剖檢、採材過程所造成之汙染機會減至零，如此才可望能早日完成撲滅本病之任務。

參考文獻

1. 林敬覆 楊喜金 黎南榮 蕭終融 吳義興 張惟茗 陳素貞 蘇杰夫：應用細胞培養技術分離結核分枝桿菌，行政院委會家畜衛生試驗所研究報告第 35 期 9-13。
2. Krasnow, I. And Wayne, L. G. : Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. Applied Microbiology, 18(5):915-917, November 1996.
3. Mackaness, G . B . 1954 . The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits . Amer . Rev . Tuberc . 69 : 495-504 .
4. Mackaness, G . B . 1971 . Resistance to intracellular infection . J . Inf . Dis . 123 : 423 .
5. Patterson, R . and G . P . Youmans . 1970 . Multiplication of mycobacterium tuberculosis with normal and "immune" mouse macrophages cultivated with and without streptomycin . Infec . Immun . 1 : 30-40 .
6. Rabinowitz, Y . 1964 . Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations . Blood 23 : 811-823 .

7. Reznikov, M . & Leggo, J . H . :
Modification of Schaefer's procedure for serotyping of organisms of the mycobacterium avium-M intracellulare and M . scrofulaceum complex . Applied Microbiology 23, 819-823, 1972 .
8. Suter, E . 1952 . The multiplication of tubercle bacilli with normal phagocytes in tissue culture . J . Exp . Med . 96 : 137-150 .
9. Suter, E . 1953 . The multiplication of tubercle bacilli with mononuclear phagocytes in tissue culture derived from normal animals vaccinated with BCG . J . Exp . Med . 97 : 235-245 .
10. T . Kardjito, I . Handoyo & J . M . Grange .
Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods . 1 . The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined . tubercle 63(1986)269-274 .
11. T . Kardjito, I . Handoyo & J . M . Grange .
Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods . 2 . Qualitative difference in the dermal response to tuberculin in patient with active pulmonary disease and health tuberculin-positive individuals . tubercle 63(1986)275-278 .
12. Thomas M . Daniel, Graciela L . De Murillo, John A . Sawyer, Anne Mclean Griffin Enrique Pinto, Sara M . Debanne, Patricia Espnosa, and Edmundo Cespedes . Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the the serodiagnosis of tuberculosis . Am Rev Respir Dis 1966 ; 134 : 622-625 .

Establishment of a Rapid Method in Cell Culture to Isolate Mycobacteria

Lin, King-Fu*, J. F. Su, Y. S. Wu, W. M. Chang and J. R. Chiau

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY

A total of 391 isolates of mycobacterium bovis (*M. bovis*) and 10 isolates of mycobacterium avium complex (*M. avium* complex) were obtained from 631 head of cattle, 175 deer and 88 goats with positive reactions by PPD (purified protein derivative) skin test. The Marc-145 cell line was used to culture mycobacteria. After 9 time passages(9-P) in Marc-145 cells, the YL strain of *M. bovis* was inoculated in slants for the acid-fast microorganism count. These results showed that the 9-P *M. bovis*-YL strain proliferated well in Marc-145 cells. This method would improve the culture procedure of mycobacteria.

Keywords: *mycobacterium bovis*, *mycobacterium avium complex*

Corresponding Author

Tel : (02)26212111 ext.207

Fax : (02)26225345

E-mail : <http://www.kflin.tahri.gov.tw>

* Corresponding Author
National Institute for Animal Health