

應用細胞培養技術分離結核分枝桿菌

林敬覆 楊喜金 黎南榮 蕭終融 吳義興 張惟茗 陳素貞 蘇杰夫

行政院農委會家畜衛生試驗所

摘要

將本所分離所得之牛型結核分枝桿菌(*M.bovis*-YL)株分別接種於初代豬肺臟大吞噬細胞(Swine alveolar macrophage,SAM)及株化細胞 OCC 和 Marc-145,並於接種後第 1,2,3,4,5,6,及 7 天分別固定、染色與鏡檢,結果顯示於接種第 3 天以後,上述三種細胞培養,經檢測結果,均可見到明顯的結核分枝桿菌增殖。

將 PPD 皮內注射測定,判定為陽性反應牛隻之淋巴、臟器組織乳劑分別以斜面培養基 (Lowenstein-Jensen medium, L-J M) 及上述組織培養進行結核分枝桿菌分離,結果顯示以上述組織培養分離者只需於接種後 7 及 14 天,便可以抗酸菌染色方法染色後鏡檢,即可判定有無結核分枝桿菌增殖。而以 Slant 分離者,則需經 5~14 週菌落形成後,才可進行鈎菌、固定、染色後鏡檢。至於其分離率經分析結果組織培養及斜面培養基培養分離牛病材並無差異,均為 43.46%(33/76)。

關鍵詞：牛型結核分枝桿菌、初代豬肺臟大吞噬細胞、斜面培養基

緒言

由於以傳統之斜面培養基 (Lowenstein-Jensen medium, L-J M) 分離結核分枝桿菌至少需時 5 至 14 週^(1,6),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^(2,3,4,5,7,8,9,10,11,12),以與斜面培養基分別分離本菌之結果分析比較,以供參考。今就所使用之方法、材料及結果等,分述於下。

材料與方法

首將本所分離所得之牛型結核分枝桿菌(*Mycobacterium bovis*, *M.bovis*)分離株(*M.bovis*-YL)分別接種於初代豬肺臟大吞噬細胞(Swine alveolar macrophage,SAM)及株化細胞 OCC 和 Marc-145,並於接種後第 1 天起每天各取 3 片 Chamber slide 固定、抗酸菌染色、鏡檢至第 7 天。

次將以 PPD 皮內注射測定,判定為陽性反應牛隻、鹿及羊之臟器淋巴組織,分別以 0.1% 之次氯酸鈉溶液清洗後,浸置於 4°C 下 12~24 小時,取出後以無菌剪刀細剪後,加入適量(3~5mL)

之 Dubos' broth 後，以電動磨碎機(Grinder)磨碎後，加入 0.5N 之 NaOH 處理 30 分鐘後，再加入 6N 之 HCl 處理 30 分鐘，最後以 1N 之 NaOH 加入中和處理 30 分鐘後，放入具有冷卻裝置之離心機以 3,000rpm 離心 30 分鐘後，倒棄上清液，將其沉澱物分別接種培養於 Chamber slide 內之 SAM 及 Marc-145、OCC 株化細胞和不含甘油之 L-J (w/o)M 及含 2% Tween 80 之 L-J (t80)M 卵培地之 Slant 斜面培養基試管後，分別放置內含 5%CO₂，37°C 之恆溫箱內培養，接種於上述組織培養者，如同上述於接種後第 1 天起，每天分別各取 3 片 Chamber slide 固定、抗酸菌染色、鏡檢至第 7 天。在斜面培養基培養方面則需 5~14 週菌落形成後，再行鈎菌、固定，抗酸菌染色後鏡檢。以 Slant 斜面培養基分離與接種於組織培養者之分離結果進行比較，以供分析、評估時之資料。

結 果

將牛型結核分枝桿菌分離株(*M.bovis-YL*)分別接種於 SAM，Marc-145 及 OCC 組織培養後，經 7 天之檢測結果發現，於接種後第 3 天可見其明顯增殖(如圖 1)。

至於分別接種 Marc-145 組織培養及 Slant 斜面培養基之 PPD 測定呈陽性反應牛試材，其接種於組織培養者，經測試發現於第一次接種後 7 及第二次接種後 7 天(前後 14 天)結果與接種在 Slant 5~14 週菌落形成後，檢測比較其分離率，結果一致均為 43.46%(33/76)(如表 1)。

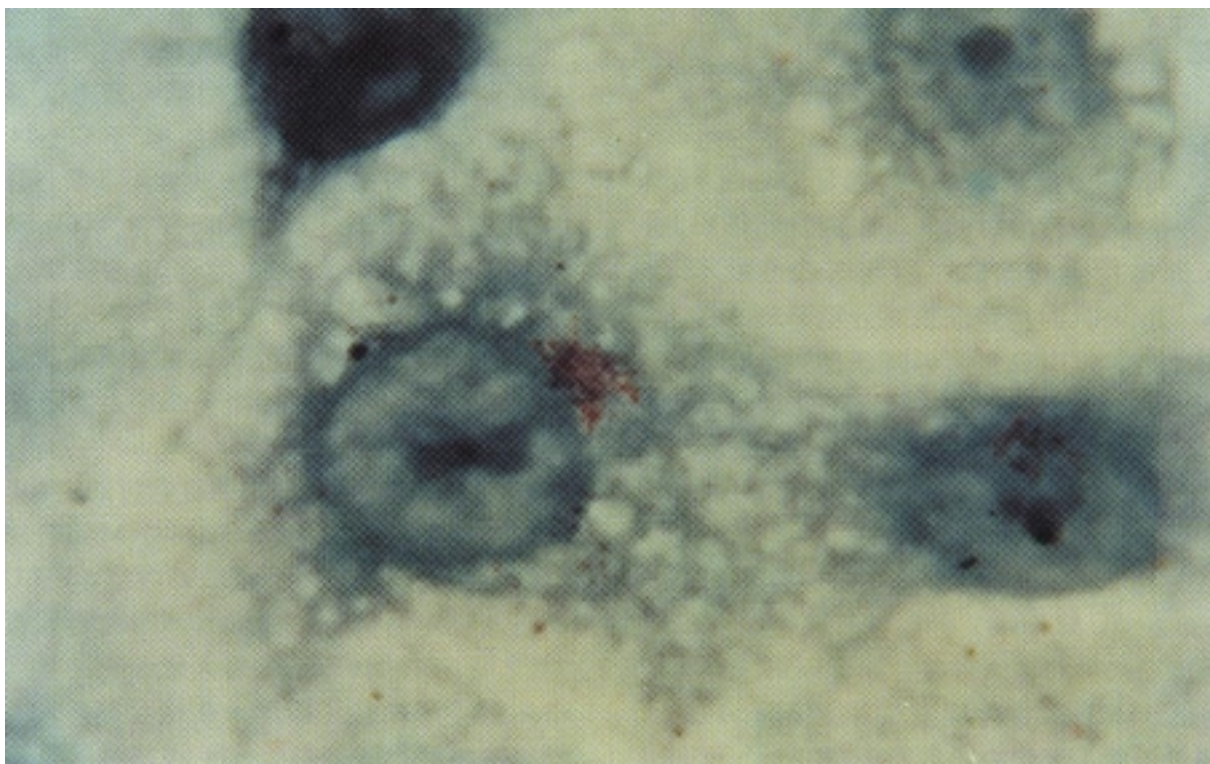


圖 1. *M. bovis-YL* 株接種在 Marc-145 細胞後第 3 天之增殖情形

表 1. *M.bovis*-YL 及 PPD 皮內注射測定，判定為陽性反應牛隻(有病灶及無病灶)之臟器淋巴組織乳劑分別接種於 Slant, SAM, Marc-145, OCC 等細胞。

縣 市	測試頭數	小計(分離菌株數/測試頭數)					備 註 欄
		Slant		Tissue culture			
		L-J(w/o)M	L-J(t80)M	SMA	Marc-145	OCC	
細胞陰性對照	2	—	—	—	—	—	
本菌(<i>M.bovis</i> -YL)陽性對照	2	+	+	+	+	+	
彰化縣	18	12/18	12/18		12/18		
嘉義縣	10	0/10	0/10		0/10		
臺南縣	20	7/20	7/20		7/20		
臺南市	3	0/3	0/3		0/3		
高雄縣	2	0/2	0/2		0/2		
屏東縣	23	14/23	14/23		14/23		
合 計	76	33/76	33/76		33/76		
百 分 比		43.46%	43.46%		43.46%		

表 2. *M. Bovis*-YL 株 PPD 皮內注射測定為陽性反應但無病灶牛隻之臟器淋巴組織乳劑分別接種於 Slant, SAM, Marc-145 及 OCC 等細胞。

縣 市	測試頭數	小計(分離菌株數/測試頭數)					備 註 欄
		Slant		Tissue culture			
		L-J(w/o)M	L-J(t80)M	SMA	Marc-145	OCC	
細胞陰性對照	2	—	—	—	—	—	
本菌(<i>M.bovis</i> -YL)陽性對照	2	+	+	+	+	+	
彰化縣	15	10/15	10/15		10/15		
嘉義縣	10	0/10	0/10		0/10		
臺南縣	19	6/19	6/19		6/19		
臺南市	3	0/3	0/3		0/3		
高雄縣	2	0/2	0/2		0/2		
屏東縣	11	2/11	2/11		2/11		
合 計	18	18/60	18/60		18/60		
百 分 比		30.00%	30.00%		30.00%		

討 論

由上述所得之初步試驗結果得知以組織培養方法分離本菌之分離率與以傳統培養基 Slant 方法分離本菌之分離率比較結果並無降低現象及如以組織培養方法代替傳統培養基 Slant 之方法分離本菌，可節省 4~13 週之分離時間。因此擬定繼續應用組織培養方法之分離本菌及進行標準化之各項試驗，以期早日完成以組織培養分離本菌之方法代替以 Slant 分離本菌之方法，以節省人力物力及縮短分離時間爭取診斷時效。

將以 PPD 皮內注射測定，判定為陽性反應牛隻之臟器淋巴組織由於接種病材之 SAM 細胞附著不佳，固定不易，以致影響其染色、鏡檢之結果，且其製備組織培養所需仔豬，取得困難，加上製造過程繁複，因此於初獲結果，經比較分析後，決定放棄 SAM 而保留使用 OCC 及 Marc-145 做為今後分離本菌及進行標準化之各項試驗。

以往養牛戶常於現場解剖時不見有肉眼病灶時，便抱怨以為是誤判誤殺而有所爭論，然而依本試驗結果以 PPD 皮內注射測定為陽性反應但無病灶牛隻之臟器淋巴組織乳劑分別接種於 Slant 及 Marc-145 細胞分離本菌之結果其分離率均為 30%(18/60)(如表 2)。由此可見於現場解剖時不見有肉眼病灶時，並非是誤判誤殺而是早期檢出，實係牛隻感染本病之初期，其病程未達產生肉眼可見之病灶而已，本試驗結果可冰釋此一爭議。

由於現行 TB 陽性反應牛、鹿及羊之撲殺政策，係將其運送至本所撲殺、採材、焚化，然而其運送途中所造成之污染程度難以估計，亦可能是本省至今未能撲滅 TB 陽性反應牛、鹿及羊之一大原因，故建議今後宜就地撲殺、焚化，以避免污染範圍擴大，早日達成清除 TB 之任務。

參考文獻

1. Krasnow I , Wayne LG . Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. Applied Microbiology, 18(5):915-917, November 1996.
2. Mackaness GB The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits . Amer . Rev . Tuberc . 69 : 495-504 . 1954 .
3. Mackaness GB . Resistance to intracellular infection . J . Inf . Dis . 123 : 423 , 1971 .
4. Patterson R, Youmans GP, Youmans . Multiplication of mycobacterium tuberculosis with normal and “immune” mouse macrophages cultivated with and without streptomycin . Infec . Immun . 1 : 30-40 , 1970 .
5. Rabinowitz Y . Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations . Blood 23 : 811-823 , 1964 .
6. Reznikov M, Leggo JH . 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 .
- 7 · Suter E . The multiplication of tubercle bacilli with normal phagocytes in tissue culture · J . Exp . Med . 96 : 137-150, 1952 .
 - 8 · Suter E . The multiplication of tubercle bacilli with phagocytes in cultivated in vitro, and the effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazide . Amer . Rev . Tuberc . 65 : 775-776, 1952 .
 - 9 · Suter E . The multiplication of tubercle bacilli with mononuclear phagocytes in tissue culture derived from normal animals vaccinated with BCG . J . Exp . Med . 97 : 235-245, 1953 .
 10. Kardjito T, Handoyo I, Grange JM . Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods . 1 . The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined . tubercle 63 : 269-274, 1986 .
 11. Kardjito T, Handoyo I, Grange JM . 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 : 275-278, 1986 .
 12. Thomas M, Daniel, Graciela L, De Murillo, John A. Sawyer, Anne Mclean Griffin Enrique Pinto, Sara M . Debanne, Patricia Espnosa , Edmundo Cespedes . Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis . Am Rev Respir Dis 134 : 622-625, 1966 .

Development the method of isolation of *mycobacteria* in tissue culture

Lin, King-Fu, C . C . Yung, N . Y . Le, J . R hiau, Y . S . Wu, Wei-Ming Chang,
S . C . Chen, J . F . SU

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

SUMMARY In order to develop a isolation method of *mycobacteria* by tissue cultures, the isolation strain of *mycobacterium bovis*-*M.bovis* *YL strain* was inoculated in the tissue cultures of swine alveolar macrophages (SAM), Marc-145 and OCC, respectively . The results revealed that the *M. bovis*-*YL strain* was found growth well in the above mention tissue cultures at 3 day after inoculation .

The specimens collecting from the positive reaction cattle by PPD(Purified protein derivative) inoculating in slants (Lowenstein-Jensen medium,L-J M) and Marc-145 cell line , respectively, for isolating the *M.bovis* . The results of the above test revealed that the *M. bovis* was isolated at 7 to 14 days after inoculating in Marc-145 cell lines , and isolated at 4 to 15 weeks after culturing in slants . Both methods of isolating rate were as same as 43.46%(33/76) .

Key words: *Mycobacterium bovis*, *M. bovis*. *Swine alveolar macrophages*, *SAM*. *Slant medium*(*Lowenstein-Jensen medium,L-J M*).