

## 鹿結核病檢驗方法之評估及菌種之鑑定

蕭終融 李淑慧 楊揚輝 吳義興  
張惟茗 葉明穎

### 台灣省家畜衛生試驗所

本試驗調查 234 頭鹿之結果，鹿結核菌素皮內反應之接種劑量應採 1 劑量（含 1000 國際單位）之牛型結核菌素 PPD。部位則以頸側部最佳。鹿之固定需配合鎮靜藥物。接種後 72 小時判定。判定標準採用英國標準（British System）。

由撲殺 4 頭鹿及另外 7 例鹿病材，分離出 6 株牛型分枝桿菌（*Mycobacterium bovis*）、4 株鳥型分枝桿菌（*M. avium complex*）及 1 株 Runyon 第四群非典型菌之 *M. chelonae subsp chelonae*，上述三種菌株均會引起人之典型或非典型結核病，深具公共衛生上的意義。

鹿隻之畜養，已成為一種新興之畜牧事業，飼養頭數不斷增加，至 75 年底，已達 50,334 頭。其畜產品（鹿茸、鹿血、鹿鞭及鹿肉等）主要是提供國人藥用或食用，因而有關人畜共同傳染病，尤其是結核病之檢查及控制，更該受重視，以確保國人健康。

鹿可被結核分枝桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、牛型分枝桿菌（*M. bovis*）、鳥型分枝桿菌（*M. avium*）和其他分枝桿菌感染<sup>(6, 8, 9, 11, 12, 13)</sup>。本省陸續發生鹿之結核病病例<sup>(1, 3)</sup>，因而鹿之結核病已成為本省公共衛生的一大問題。

本報告評估不同劑量的結核菌素 PPD 與其在梅花鹿（*Cervus nippon taiouanus*）及水鹿（*Cervus unicolor Swinhoei*）之皮內反應間之關係，以作為全面控制本病之參考。此外，並由病畜分離病原菌，以鑑定其菌型

### 材料與方法

#### 1. 不同檢驗劑量之調查：

每隻鹿以 3 至 6 cc 之 2% Rompun 鎮靜後，並輔以工作人員捕捉固定，於頸側部行皮內接種。接種部位將毛剃淨，以利操作及判定。於三個不同部位，分別接種 1 劑量、 $\frac{1}{2}$  劑量及  $\frac{1}{4}$  劑量（1 劑量 = 1,000 IU），每部位接種 0.1 ml。診斷液採用澳洲 Commonwealth Serum Lab 製售之牛型結核菌素 PPD（Purified Protein Derivative, 3 mg/ml）。注射後 72 小時判定。注射前後皮膚之腫脹差在 5 mm 及以上者判為陽性，在 3.0 至 4.9 mm 者為疑陽性，在 3.0 mm 以下者為陰性。陽性鹿隔 6 - 8 週，再做併比試驗，於頸兩側分別皮內注射 1、 $\frac{1}{2}$  及  $\frac{1}{4}$  劑量的牛型 PPD 及鳥型 PPD。

2.結核菌種之分離及鑑定：

斃死或反應陽性撲殺鹿，行標準病理解剖，採取相關及可疑病材行病理組織切片檢查及病原菌之分離及鑑定。

結核菌種之分離及鑑定依照Runyon等<sup>10</sup>所述和美國農業部頒布之方法<sup>11</sup>：將病材除去周圍脂肪組織，浸泡於0.1%次氯酸鈉溶液保存於4℃過夜，換新鮮0.1%次氯酸鈉溶液（此步驟必要時可重覆多次）。細菌分離時，無菌操作，將病材剪成小塊，加入適量含有0.4% Phenol red之Tryptic soy broth，製成乳劑，加入適量之0.5 N NaOH 至乳劑混合均勻，使乳劑顏色變紅，靜置10 - 30分，再加入適量之6 N HCl 混合均勻，至顏色變黃，靜置10 - 30分鐘，再加入適量之1 N NaOH混勻至顏色變紅。於3,000 - 3,500 r.p.m. 離心30分，除去上清液，取沈渣接種在Lowenstein-Jensen及Stonebrink's等斜面培養基，逐週觀察，至少觀察12週。若有可疑菌落先行抗酸性染色，並觀察其菌落生長速率和形態，再接種至含有10% Dubos Oleic Albumin Complex (Difco 0375)

之Dubos Broth (Difco 0385) 增菌後，測其Niacin test (Difco 1479) 及於45℃生長之情形。再做下述之抗藥試驗：抗INH( Iso-niazid-Isonicotinic acid hydrazid )，TCH( Thiophen - 2 - carboxylic acid hydrazid )及Neotetrazolium chloride 等藥物。然後用極東抗酸菌鑑別組（極東製藥工業株式會社）測其：發育速度3日試驗及在PNB培養基、硝酸還原試驗（24小時），Tween 80水解試驗（5天）、PAS培養基黑變（7天）、EB培養基、HA培養基、Picric acid培養基及暗發色和光發色培養基等之變化及發育情形而加以鑑定其菌型<sup>12</sup>。

結 果

1.鹿結核菌素檢驗方法之測定：

於頸側部分別接種1、1/2及1/4劑量之牛型結核菌素PPD。在4縣市16家牧場共進行234頭（20頭水鹿和214頭梅花鹿）。若以現行牛結核菌素皮內反應之判定標準，其結果為陽性反應鹿計5頭，疑陽性者計3頭（表1），其餘為陰性反應。8頭反應鹿中，撲殺4

表1 八頭牛型PPD反應鹿的檢查結果

鹿號	A	B	C	D	E	F	G	H
腫脹差								
1 劑 量	6.6	5.57	6.68	9.58	3.10	3.75	9.58	3.4
1/2 劑 量	5.3	4.09	5.05	4.48	2.43	3.26	8.14	0
1/4 劑 量	4.2	3.56	1.57	1.83	1.65	2.93	6.6	0
皮內反應判定	+	+	+	+	±	±	+	±
鹿 種	梅花鹿	梅花鹿	梅花鹿	水 鹿	水 鹿	梅花鹿	梅花鹿	梅花鹿
性 別	♂	♂	♀	♀	♀	♀	♂	♀
年 齡 ( yr )	3	3	3	6	2	2	3	3
場 別	甲	甲	甲	甲	甲	甲	乙	乙
撲 殺				+	+		+	+
巨 視 病 變				+	+		+	+
組 織 病 變				+	+		+	+
組織切片抗酸菌				-	+		-	+
細 菌 分 離				+	+		+	+
菌 型	四株皆為 <i>M. avium complex</i>							

表2 分離菌株之生長特性、抗藥性試驗及生化特性反應之結果

特性	分離菌株	反應陽性 撲殺鹿 4 株	興大 5 株	宜縣 1 株	台東縣 1 株
初代分離時間		5 週	7 - 8 週	7 週	4 週
45 °C 生長		+	-	-	+
抗 INH		+	-	-	+
藥性 TCH		+	-	-	+
試驗 Neo		+	-	-	+
cording		-	+	+	-
Niacin test		-	-	-	±
發育速度 3 日試驗		-	-	-	+
菌落性狀		S	R	R	R
PNB 培養基		+	-	-	-
硝酸還原試驗 ( 24 小時 )		-	-	-	-
Tween 80 水解 ( 5 天 )		-	-	-	-
EB 培養基		+	-	-	+
Picric acid 培養基		-	-	-	-
PAS 培養基黑變 ( 7 天 )		-	-	-	+
HA 培養基		+	-	-	+
光發色		-	-	-	-
發色					
暗發色		-	-	-	-

頭以行病理檢查及病原菌分離 ( 表 1 ) 。

4 頭撲殺鹿之併比試驗 ( comparative test ) ，僅一頭有反應，其反應如下：

鳥型結核菌素 PPD : 1、 $\frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$  劑量之腫脹差為 11.01、8.93 及 5.49 mm 。

牛型結核菌素 PPD : 1 及  $\frac{1}{2}$  劑量之腫脹差為 10.35 及 7.51 mm 而  $\frac{1}{4}$  劑量則無反應。

#### 2. 病原菌分離：

(1) 由 4 頭撲殺鹿分離出 4 株抗酸菌，其鑑定結果如表 2 。

(2) 由中興大學轉送 5 例病材，宜蘭縣及台東縣家畜疾病防治所各分別轉送 1 例病材，其鑑定結果如表 2 。

由表 2 之結果，根據美國農業部<sup>(7)</sup>及極東抗酸菌鑑定組<sup>(4)</sup>的方法，可判定 4 頭撲殺鹿之病原菌為 *M. avium complex*，由中興大

學轉送 5 例及宜蘭縣家畜疾病防治所轉送的 1 例病材之病原菌均為 *M. bovis* 而台東縣家畜疾病防治所轉送的 1 例病材之病原菌為 *M. chelonae subsp. chelonae* 。

### 討 論

若以現行牛結核菌素反應標準判定，本實驗調查鹿隻結核菌素反應陽性率為 2.14 % ( 5 / 234 ) ，疑陽性率為 1.28 % ( 3 / 234 ) 。若分別就不同鹿種統計，則梅花鹿陽性率為 1.87 % ( 4 / 214 ) ，疑陽性率為 0.93 % ( 2 / 214 ) ，而水鹿則分別為 5 % ( 1 / 20 ) 及 5 % ( 1 / 20 ) 。鹿場污染率為 12.5 % ( 2 / 16 ) 。上述各項比例數據與吳<sup>(2)</sup>之報告相比都較偏低，此乃本實驗進行之鹿場，均是畜主自願受檢，自認為其飼養狀況優良，因而

數據偏低。而所分離之菌株 *M. avium complex* 不會引起顯著的臨床症狀，此點與畜主自行觀察之結果相符。

由表 1, 3 頭疑陽性反應鹿的年齡均較低，此結果與年齡愈大，感染結核病的可能性增高的論點相符<sup>(10)</sup>。結核病的感染無性別差異，本調查結果亦與此相符<sup>(10)</sup>。

由 8 頭反應鹿的腫脹差數據 (表 1)，分別就 1 劑量與 1/2 劑量、1 劑量與 1/4 劑量及 1/2 劑量與 1/4 劑量三組，做 t 試驗的統計分析，其 t 值分別為 3.54、4.19、及 2.90，其 p 均小於 0.05，表示不同劑量所引起反應之腫脹差有顯著差異，即表示反應的腫脹差與注射的 PPD 劑量成明顯之正相關。

若以現行牛結核菌素皮內反應之判定標準，8 頭反應鹿的判定結果如表 1。但 George V. Kollias 等<sup>(6)</sup>認為鹿隻對結核菌素的反應判定，宜採取較嚴格的 British System，即腫脹差超過 3 mm 者為陽性反應，2-2.9 mm 者為疑陽性反應，2 mm 以下者為陰性反應。若以 British System 為標準，則 8 頭反應鹿均為陽性，惜限於經費；未能撲殺另外 4 頭以做資證，然由撲殺 4 例中，均可見巨視及顯微病變，並可由病變處分離出病原菌 *M. avium complex*，故鹿之結核菌素反應標準宜採較嚴格的 British System。

接種劑量應以 1 劑量為佳，因本試驗接種 234 頭，無反應者 226 頭中，1、1/2 及 1/4 劑量均不會引起腫脹，而由表 1 數據經 t 試驗後，若知有反應，其腫脹情形與劑量成正相關。而本實驗中無反應者，接種 1 劑量仍未引起腫脹，即表採取 1 劑量應不會引發為陽性，此推論亦與 Kollias 等人之觀點相符<sup>(6)</sup>。

撲殺 4 頭陽性鹿，分別來自甲、乙兩鹿場，甲場距乙場畜主之養牛場約百公尺，而乙場鹿隻曾於乙場畜主之養牛場混養約三週。該養牛場由原先清淨場轉為 TB 污染場，其反應陽性牛經撲殺後，亦曾分離出 *M. avium complex*，因此鹿與牛之間及甲鹿場與乙牛場之間，其疫情是否相關，有待進一步之調查。

4 頭撲殺鹿，均曾進行併比試驗，惜僅有 1 頭有完整數據。接種 1、1/2 及 1/4 劑量鳥型

PPD 之腫脹差為 11.01、8.93 及 5.49 mm，遠較接種 1 及 1/2 劑量牛型 PPD 之腫脹差 10.35 及 7.51 mm 大。由併比試驗的結果，即可推論感染鳥型分枝桿菌的可能性較高，此推論與併比試驗的特性及分離之菌株相符。

由實地操作知鹿隻之固定仍以藥物鎮靜或麻醉後，佐以工作人員之捕捉較佳。然本實驗使用 2% Rompun 對水鹿之效果不佳，對梅花鹿之效果有個體上之差異，因此應另覓較佳之藥物為宜。鹿隻接種部位以頸部較佳，因易於觀察及判定。

*M. avium complex* 中包括 *M. avium* 及 *M. intracellulare* 兩型菌株，其間之分辨需藉標準血清<sup>(10)</sup>，因目前無標準血清，故只能以 *M. avium complex* 稱之。

本實驗由鹿共計分離 6 株 *M. bovis*，4 株 *M. avium complex* 及 1 株 *M. chelonae subsp chelonae*，上述三型菌株均會引起人之典型或非典型結核病，深具公共衛生上的意義<sup>(10)</sup>，值得有關單位重視。

## 參考文獻

1. 吳永惠，1986 台灣鹿隻結核病的研究 I. 流行病學調查、病原分離鑑定及病理變化，中華民國獸醫學會雜誌 12: 323 - 329。
2. 陳守仕、蘇杰夫、林榮福、廖述吉、鄭建盛、張瑞森、劉正義，1979 台灣結核菌素陽性反應乳牛之結核病原分離及鑑定，科學發展月刊 7(7): 724 - 732。
3. 台灣省政府農林廳，1986 台灣省各縣、市家畜疾病防治所調查研究報告。
4. 極東製藥工業株式會社。極東抗酸菌鑑別ゼト。
5. Dodd K. 1984. Tuberculosis in free living deer. Vet. Rec. 115: 592-593.
6. Kollias G.V., C.O. Theon and M. E. Fowler. 1982. Evaluation of comparative cervical tuberculin skin testing in cervids naturally exposed to mycobacteria. JAVMA

- 181(11):1257-1262.
7. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology, 1974. Veterinary services Lab. Animal and Plant Health Inspection service U.S. Dept. Agriculture. Ames, Iowa, January.
  8. Matthews, P.R.J., A. McDiarmid and P. Collins. 1981. Mycobacterial infections in various species of deer in the United Kingdom. Br. Vet. J. 137:60-66.
  9. Orr, M.B., A.R. Hunter, D.Brand et al. 1978. Experimental Challenge of red deer with *Mycobacterium avium*. Vet. Rec. 102: 484-485.
  10. Runyon E.H., A.G. Karlson, G.P. Kubica and L.G.Wayne. Manual of Clinical Microbiology. 3rd. ed. America society for Microbiology Washington, D.C. U.S.A. 150-179.
  11. Sawa, T.R., C.O. Thoen and W.T. Nagao. 1974. *Mycobacterium bovis* infection on wild axis deer in Hawaii. J.A.M. Vet. Med. Assoc. 165:998-999.
  12. Walton, T. 1985. Tuberculosis replacing claytons with the real stuff. The Deer Farmer, 17-19.
  13. Wilson, P. and R. Harrington, 1976. A case of bovine tuberculosis in fallow deer. Vet. 98:74.

EVALUATION OF COMPARATIVE TUBERCULIN SKIN TEST AND  
ISOLATION OF MYCOBACTERIA IN DEER NATURALLY  
EXPOSED TO MYCOBACTERIA IN TAIWAN

Shiau, J.R., S.H. Lee, Y.H. Yang, Y.S. Wu,  
W.M. Chang and M.Y. Yeh.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Two hundred and thirty-four deer were tested with 1 dose (1,000 IU) bovine PPD. PPD was injected intradermally at the cervical sites. The results were determined 72 hours after injection according to British system.

Six strains of *Mycobacterium bovis*, 4 of *M. avium complex* and 1 of *M. chelonae subsp. cheponei* were isolated from 11 deer. Those 3 Mycobacteria species are important in public health since they will cause typical or atypical tuberculosis in human.