牛結核菌素製造改進試驗

吳義興[1]　謝快樂[1]　陳　清[1]　賴俊雄[1]　呂清泉

王金和[1]　吳福明[2]　P. HUMMEL[3]

摘　　要

臺製 Vallee 株結核菌素及本所保存株混合結核菌素 No. 39，與德製標準結核菌素比較，力價均可達 50,000IU/ml，且通過雜菌、安全、無刺激性及無致敏性各種試驗。以歐洲處方之改良式無蛋白培養基製成結核菌素之產量，確較舊式之 Sauton 培養基為多。田間試驗共測定 277 頭牛，二種臺製結核菌素與德製結核菌素均接種於頸側部位，此外 No. 39 結核菌素照例行檢查牛結核病之方法亦同時接種於尾根部位。頸側接種後皮膚腫脹差在 2 mm 以上或有硬結之 73 頭牛中僅有 1 頭尾根注射後之腫脹差超過 5 mm。反應陽性牛 73 頭經剖檢結果，29 頭有結核病變。病灶檢出率以德製結核菌素較佳為（86.2%），臺製 No. 39 結核菌素及臺製 Vallee 株結核菌素同為 69.0%。

緒　　言

本省之牛結核病撲滅作業，係採用以結核菌素之皮內反應試驗摘出陽性者，予以撲殺的方法。自 1956 年度開始執行此種方已二十多年，其間本省乳牛之結核病反應陽性率曾有顯著的下降，至 1973 年度，其陽性率曾降低至 0.02%。此數值雖較歐美等先進國家之陽性最低率達 0.008%[13] 相差還遠，但在本省牛隻結核病防疫工作上，可看出撲殺政策已有良好之效果。然而 1974 年度起陽性率又開始上升，1977 年度更急激地上升至 0.57%，而本年度（1979）之檢查結果仍有 0.28%。此種反常之現象，推測其原因可能為過去臨床獸醫師接種牛結核菌素時之操作方法，例如接種部位，測量方式等技術之不確實，造成不正確的皮膚腫脹差度之結果，使陽性牛發現率減低，並受 1977 年度成立緊急撲殺專案計畫之影響，在嚴格及認眞的執行檢驗及撲殺工作下，陽性率大增。或所使用之結核菌素的敏感度有問題，因本省結核菌素之檢定，仍對以牛結核菌死菌敏感化之天竺鼠，接種前批合格產品及待檢新產品，如其皮內反應結果接近時，即認為該批產品合格[2]。此種效力檢定方法會因有一次不正確之判定，即影響以後所有各批產品之品質。又近 4 年之結核菌素皮內反應陽性牛中，肉眼及組織病灶陽性牛佔之百分比，在 1976 年度竟達 100%，1977 年為 92.4%，1978 年為 86.4%，然而雖經這三年來之大量撲殺，本年度仍然高達 80.77%。有此種現象出現之原因可能為結核菌素之敏感度偏低，或現行診斷標準（以皮膚腫脹差在 5 mm 以上方為陽性）失之過寬，不能有效的檢出大部份之病灶牛，而只能檢查出少數較嚴重感染之病牛所致。此點更由近年來於陽性牛之剖檢，發現大多數之病牛有瀰漫性之全身嚴重病變，更增加上述推測之可能性。當結核菌素不能敏感的檢出所有結核病牛，則所留下的假陰性保菌牛將成為持續傳播源，而嚴重的阻礙結核病之有效控制。

本省牛結核菌素製造用之種菌株，仍沿用二十多年前由日本分得之牛型菌 RO 株及 #10 牛株與 1 株人型弱毒青山株，經這些年之繼代使用，種菌株之抗原性迄未做過檢討。製造過程亦採取一向之方式，即 3 株結核菌分別培養製成結核菌素，再予等量混合而成。此種製造方法與歐美各國之結核菌素均以單一之結核菌製造者不同。尤其最近陳等[1]指出，由臺灣結核病乳牛分離之菌株均為牛型菌，而令人懷疑本省目前所製之結核菌素中，添加人型菌是否有此必要。

本省於牛結核菌素之製造方面、如有關培養基、培養時間、製造及濃縮過程及結核菌素之檢定與

1.臺灣省家畜衛生試驗所
2.行政院農業發展委員會
3.臺大德籍客座副教授

轉載自中華民國獸醫學會雜誌第五期
Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 15：1— (1978)

接種結核菌素後之判定標準等，均沿襲二十多年前日本之標準迄未作檢討。上述各點與歐美各國現行之標準規定[15]，有許多不同處。尤其在判定標準上，我國目前規定皮內接種 72 小時後之腫脹差在 5 mm 以上爲陽性，而歐洲各國則以 2 mm 以上爲陽性判定標準，更是顯著之不同。本報告擬就此點予以研究檢討。

材 料 及 方 法

結核菌株：牛型 RO 株、牛 #10 株及人型弱毒青山株均爲臺灣省家畜衛生試驗所（以下稱爲本所）繼代保存之製造牛結核菌素所用之菌株。另外牛型 Vallee 株爲德國 Paul Ehrlich Institute 所分讓者。

結核菌素之製造方法：依照本所一向之製造方法，亦即將 3 株結核菌分別培養於 Sauton 無蛋白培養基[3]，經 10 到 12 週之培養後，於 12°C 高壓蒸氣滅菌 2 小時，過濾去掉菌體，濾液以蒸氣加熱濃縮爲原量 1/10，並加入 0.5%石碳酸，於 4°C 靜置 2 週後，以 150g 離心 15分 鐘，取上清液（除各株單一結核菌素均各保留一部份做試驗外）等量混合而成臺製 No. 39 結核菌素，於分裝後保存 4°C 備用。

此外以本所保存之 3 株結核菌及 Vallee 株結核菌分別培養於歐洲結核菌素製造用培養基（其成份爲每公升培養基中含 asparagine 10gm, K_2HPO_4 1.8gm, Iron citrate 0.1gm, Sod. citrate 0.9gm, $MgSO_4 . 7H_2O$ 1.5gm, glycerine 50ml 及 glucose 2.5gm），經過 8 到 10 週之培養後，殺菌及過濾，並濃縮爲原量⅕，加等量之 1%石碳酸液，放於 4°C 2 週以上，取上清液分裝後仍保存於 4°C 備用。

結核菌素之一般檢查：所製成之結核菌素在測定力價之前先做下述各項測定：(1)石炭酸含量測定。依美國藥典（USP）所載之法測定之。(2)安全及無菌試驗。製成之結核菌素皮下接種於各 5 隻體重 16～18gm 之小白鼠，每隻接種 0.5ml，觀察 2 小時以上。另皮下接種於 2 隻 400～500gm 天竺鼠 1 ml/100gm 體重，觀察 7 天。各種結核菌素接種培養於 Thiogly-collate broth, glucose broth 及 Sabouraud medium 各 2 支，分別培養於 37°C 及室溫，觀察 10 天以上。(3)敏感化試驗[15]。每種結核菌素使用天竺鼠各 4 隻，其中 2 隻先以 0.1ml 含約 500 單位之結核菌素皮內接種 3 次，每次間隔 5 天，最後一次接種後 15 天，4 隻天竺鼠同時皮內接種 0.1ml 含約 1500 單位之結核菌素，比較其反應有否差異。

結核菌素之力價試驗[15]；於 400～500 gm 之天竺鼠，皮下接種經培養 4 週之 Vallee 株活菌 0.5ml（懸於 0.5ml 之生理鹽水），以致敏感天竺鼠。接種後第 5 週，先取 2 隻皮內接種 20 單位之標準結核菌素（德國進口），經 48 小時小時後檢查，敏感化天竺鼠應有皮膚反應。每種結核菌素使用 10 隻敏感化天竺鼠，先將其兩腹側剃毛，各側再以色筆作 6 個直徑 2cm 之圓圈，然後左側接種稀釋之標準結核菌素（100,000IU/ml）0.1ml，各含 100,50,25,10,5 及 2.5 單位，右側接種同等稀釋之待測結核菌素。接種後 24 及 48 小時各測安一次其紅腫程度，若紅腫直徑超過 10mm 則爲陽性。

田間牛隻試驗：將製成之臺製結核菌素 No. 39 及 Vallee 株結核菌素及德製 Vallee 株結核菌素，同時接種於經常有陽性牛出現之牧場之牛隻頸側，接種部位事前先刮毛及測定局部皮膚厚度，分爲 3 部位，每一部位皮內接種調整好濃度（50,000IU/ml）之結核菌素 0.1ml，同時尾根部並接種本所 No. 39 結核菌素以資比較。經 72 小時後測定每一接種部位之皮膚腫脹差，除尾根部之皮厚差超過 5mm 者按規定撲殺，其他若頸部皮膚腫脹差 2mm 以上均勸導畜主出售屠宰，再追踪赴屠場採取病材，供病理及組織切片檢查，並依美國農業部及 HEW[13,14] 規定之方法作微生物之分離及鑑定。

結　　果

以 Vallee 株、青山株、 RO 株及牛 #10 株結核菌分別培養於兩種用製造培養基，培養 10 週製成之各種結核菌素及本所之 No. 39 結核菌素，經測定其石炭酸含量均在 0.45～0.55% 之間。各結核菌素經接種於 Thioglycollate broth 、glucose broth 及 Sabouraud mediuin ，置 37°C 及室溫分別培養 10 天，均無任何雜菌或黴菌。

各種結核菌素經皮下接種小白鼠，觀察 3 小時並無任何異常之反應。又將其皮下接種於天竺鼠，觀察 1 週亦無任何臨床上之異常反應，第 8 天將天竺鼠剖檢亦不見有任何可疑之病灶。爲測定結核菌素有無致敏天竺鼠之作用，乃將天竺鼠如試驗方法所述間隔 5 天連續皮內接種 3 次再與對照組天竺鼠皮內接種等量結核菌素，結果均無任何紅腫反應。

各製成之結核菌素分別與德製標準結核菌素 (100,000IU/ml) 同時稀釋後，皮內接種於敏感化天竺鼠，接種後 24 及 48 小時測定其紅腫程度，紅腫直徑需超過 10mm 以上方予計數。測定結果，本次按本所沿用方法研製之結核菌素除青山株結核菌素力價達 100,000IU/ml 外，本所 No. 39 及 Vallee 株結核菌素均爲 50,000IU/ml ，其他 RO 株及牛 #10 株之結核菌素之力價均僅有 25,000IU/ml 。以本所保存之 3 株以 Sauton 培養基及以改良式歐洲培養基與製造法所製成結核菌素，於力價測定時並無明顯之力價差異，於天竺鼠皮內反應則以 24 小時較 48 小時所測定者明顯。

選定臺南及嘉義等地區經常有陽性牛出現之牧場 3 場做田間試驗。共測試 277 頭牛，其中對任何一種結核菌素皮厚差超過 2mm 者或硬結者均予選出，共有 73 頭，其中 1 頭因尾部腫差超過 5mm ，依法撲殺，另 1 頭因外傷在當地緊急屠殺，其餘 71 頭均運到北部出售屠殺，經肉眼及組織切片檢查， 73 頭中有 29 頭有結核病灶。各種結核菌素之皮內反應陽性率及病灶牛陽性率如表 1 ，德製結核菌素及臺製 Vallee 株結核菌素之皮內反應陽性率均爲 74% 較本所 No. 39 結核菌素所得 63%爲高，但病灶陽性率則以德製結核菌素之 86.2% 較其他二種之 69% 爲優。

頸側接種結果， 29 頭病灶陽性牛之皮膚腫脹差大部份分佈於 2～4mm 之間（表 2），德製結核菌素以 2～3mm 間者最多，本所 No. 39 及臺製 Vallee 株結核菌素則在 3～4mm 間者最多。各種結核菌素皮內反應陽性牛中，如表 3 所示結核病灶之檢出率若以 2mm 皮膚腫脹差爲基準，則以德製結核菌素爲最佳達 46.3% ，本所 No. 39 結核菌素爲 48.5% ，臺製 Vallee 株結核菌素爲 37% 。

表 1. 本次研製 [a]Vallee 株與 No. 39 結核菌素與德製 Vallee 株結核菌素之田間試驗結果

結核菌素種類	頸側檢查陽性率[b]	病理解剖陽性率[c]
德　製 (Vallee 株)	54/73 (74.0%)	25/29 (86.2%)
臺　製 (Vallee 株)	54/73 (74.0%)	20/29 (29.0%)
臺　製 (#39)	46/73 (63.0%)	20/29 (29.0%)

a. 三種結核菌同時在牛頸面作皮內反應 ，共測 277 頭牛依歐州標準皮厚差 2.0mm 以上或有硬結者爲陽性，經綜合判定結果有 73 頭陽性，經屠殺檢查時發現 73 頭中 29 頭有結核病變。

b. 單一結核菌素皮內反應陽性頭數 / 綜合三種結核菌素皮內反應陽性頭數

c. 單一結核菌素皮內反應陽性牛中之病灶牛頭數 / 綜合三種結核菌素皮內反應陽性牛中之全部病灶頭數

病理檢查：此次 29 頭病灶陽性牛，除 2 頭因在當地屠宰外，其餘 27 頭均經詳細檢查其臟器及淋巴節，其病灶分佈情形如表 4 所示，以咽後淋巴結的出現率最高，其次爲肺門淋巴節及腸間淋巴結，除肺外其他臟器中均無發現結核病灶。結核結結病灶直徑由 0.2cm 到 5cm 不等，但此次檢查中大部份爲小結節小結節呈黃色硬節，大結節則中央有黃色泥狀物（圖1），切片下鏡檢可見乾酪樣壞死，部份鈣化，四週環繞著巨噬球及類上皮細胞及纖維細胞；亦有 Langhan 氏細胞存在其間（圖2），呈典型之結核病變。但有些病例，鏡檢下只呈一大片壞死及小區域之鈣化而無細胞反應。另有些病灶則只有大量的各種炎症細胞反應，但無鈣化及壞死現象。

表 2. 病灶陽性牛（29 頭）於各腫脹差間之分佈比率

腫脹差 (mm)	德製結核素		本所 No. 39 結核素		Vallee 株結合素		No. 39 尾根注射	
	牛數	%	牛數	%	牛數	%	牛數	%
0-1	0	0	4	13.8	3	10.3	21	72.4
1-2	4	13.9	5	17.2	6	20.7	2	6.89
2-3	12	41.4	6	20.7	3	10.3	1	3.45
3-4	7	24.1	10	34.5	9	31.0	1	3.45
4-5	3	10.3	1	3.05	2	6.89	3	10.3
5 以上	3	10.3	3	10.3	6	20.7	1	3.45

表 3 各種結核菌素皮內反應陽性牛中結核病灶之檢出率

皮膚腫脹差	頸側接種			尾根接種
	德製結核菌素	本所 No. 39 結核菌素	Vallee 株結核菌素	本所 No. 39 結核菌素
5mm 以上	3/7* (42.85%)	3/5* (60.0%)	6/11* (54.5%)	1/1* (100%)
4mm 以上	6/16 (37.5%)	4/9 (44.4%)	8/18 (44.4%)	4/7 (57.1%)
3mm 以上	13/27 (48.1%)	14/27 (51.8%)	17/37 (45.9%)	5/9 (55.5%)
2mm 以上	25/54 (46.3%)	20./46 (43.5%)	20/54 (37.0%)	6/14 (42.85%)
1mm 以上	29/63 (46%)	25/61 (41.0%)	6/66 (39.4%)	8/17 (47.0%)

註1：共撲殺73頭牛結果有病灶者29隻（39.7%）。

*：分母爲該腫脹差以上之牛數，分子爲此腫脹差以上之病灶牛數。

表 4 病灶陽性牛之結核病灶分佈情形

病變部位	淋巴結名稱						肺
	咽後	頸部	縱膈	肺門	腸間	耳下	
陽性病灶率 (%)	13/27 48.1	2/27 7.4	10/27 37.0	11/27 40.7	11/27 40.7	2/27 7.4	9/27 33.3

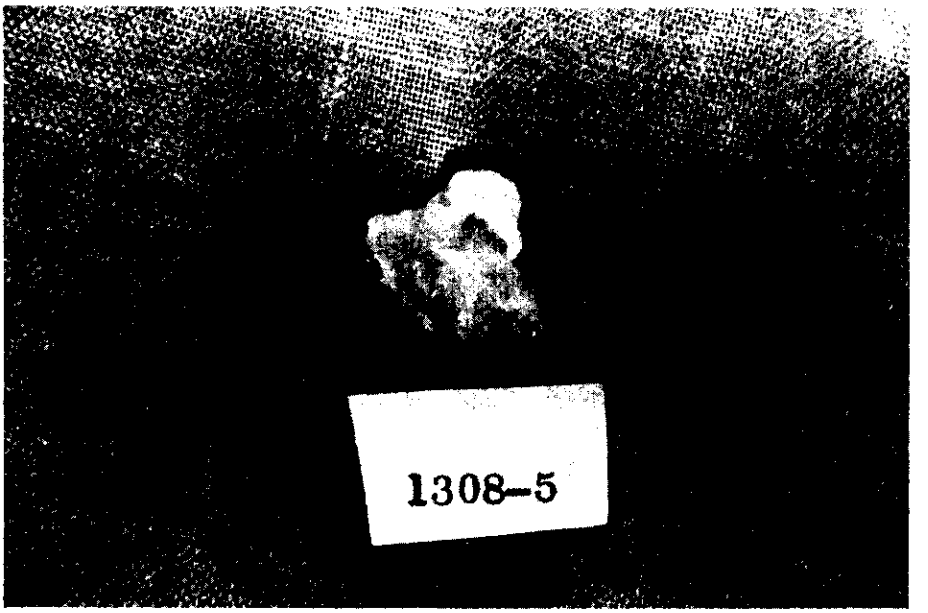

圖1　解剖牛結核病灶組織。肉眼觀察，結節中含有泥狀物。

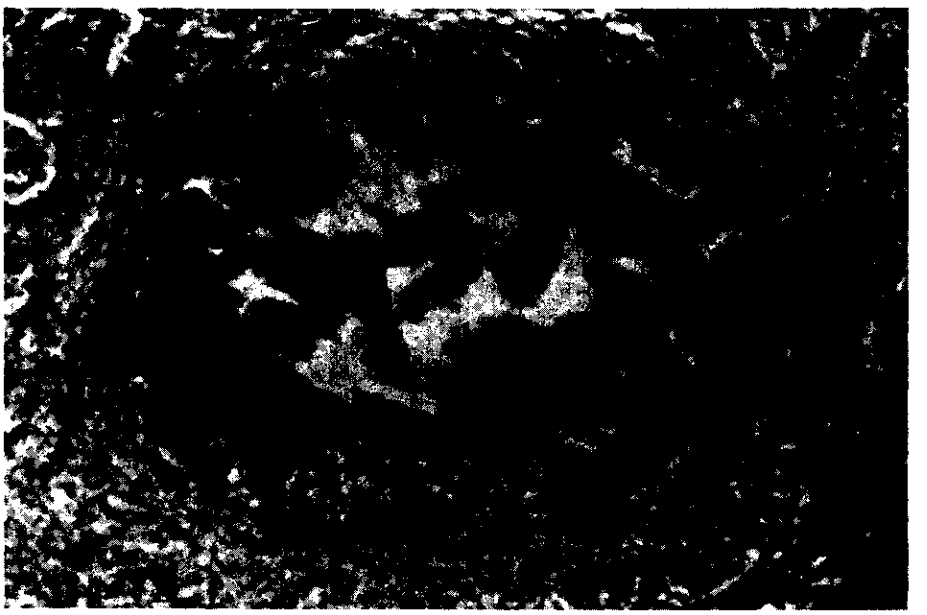

圖2　結核病灶組織切片，中央呈空洞及鈣化，H. E. 染色，40×。

討　　論

此次研製之結核菌素均依 WHO [15] 所定之標準予以檢定及測定力價，力價方面以青山株結核菌素最佳，根本等 [3-5] 在比較青山株、牛 #10 株及 RO 株之結核菌素產量結果亦以青山株爲最高。對天竺鼠而言，青山株結核菌素用於診斷牛型結核病並無大礙，反而顯得敏感性較高。 Francis *et al.* [7] 以牛型及人型 PPD 結核菌素在牛之試驗結果，認爲以牛型製造之 PPD 結核菌素之特異性較高，此點於最近 Lesslie *et al.* [12] 之試驗亦有相同之結論。

使用 Sauton 培養基製成之結核菌素之力價，雖與歐洲式培養基製造者相差無幾，但事實上於濃縮過程，舊法爲濃縮到原量1/10，再加石碳酸 0.5 %，而歐洲標準製法，則只濃縮爲原量1/5，再加等量之 1% 石碳酸液，故後者之成品濃度應爲前者之 4 倍高。關於 Sauton 培養基， Magnusson [9] 認爲它用於結核菌素之製造，產量並不理想，根本等 [3-5] 在比較 Sauton 培養基及其他多種無蛋白培養基後，亦得相同的結論，但他們認爲若把成份中之 Asparagine 量加倍或換以麩氨酸鈉（Sod. glutamate）則可提高結核菌素之產量，若能再加入微量之礦物質則可大量提高其產量。

3 種結核菌素接種於頸部之皮內反應之結果比較，德製結核菌素在皮內反應陽性率及病灶陽性率上均較其他兩種臺製結核菌素爲優。此 2 種之 1 的 Vallee 株結核菌素，不管其菌株，培養基成份或製造過程均依歐洲標準方法製成者，但其田間試驗結果也比德國製品爲劣，此種原因尚需加以研究及檢討。

田間試驗結果顯示，頸側皮內接種之敏感性較尾根接種者爲高。 Merchant *et al.* [10] 亦曾提及相同結果。但尾根接種之操作較簡單而迅速，且不必有接種前剃毛之麻煩，似乎較適合大牧場之應用。頸部皮內接種試驗，若以皮膚腫脹差 2mm 爲基準，即剖檢時之病灶陽性牛雖只佔皮內反應陽性牛之 46%，但却可檢出所有病灶牛之 86.2%（29 頭中之 25 頭）。爲期迅速撲滅本省牛隻結核病，將診斷時之陽性基準改爲頸部皮內接種後皮膚腫脹差 2mm 以上似較爲恰當。惟此基準是否可使用於尾根部皮內反應，因本次未詳細量度尾根部之腫脹差，故需再做 1 次試驗後才能瞭解是否恰當。對於疑陽性牛，本省以往在判定後 2 週再做一次尾根部皮內接種測定，但在診斷基準尚未修改前，若能依 Kerr 等所提之 Stormont test [8] 爲 1 週後即再接種，並經 24 小時後即予判定，或可更提高結核病灶牛之檢出率。屠宰牛之結核病灶組織切片，顯示有許多非典型之病灶。由於他種分枝桿菌亦會感染牛而形成限局性小病灶 [6]。故雖陳等 [1] 於最近報告中指出，本省結核病灶牛均爲牛型結核菌，但本省乳牛是否無鳥型或其他種分枝桿菌之感染，有賴今後之繼續研究始可明瞭。

本次試驗因需屠殺之牛隻均賣給肉販後於北部屠殺。因本省牛隻屠殺前後有灌水之惡習且屠宰場髒而陋，故採得之病材均受到嚴重污染，致分離試驗均失敗，有待改進。

誌　　謝

本研究計劃承農發會及乳業發展小組經費補助，特致衷心謝意。並承李主任委員崇道，鑑組長博、林技正本欽及陳所長守仕之鼓勵，得以完成，在此一併致謝。對農林廳蔡股長義雄、張瑞森及余建中先生以及臺南縣、嘉義縣及臺南市各家畜疾病防治所同仁之大力支持，特致謝忱。

參　考　文　獻

1. 陳守仕、蘇杰夫、林榮福、廖述吉、鄭建盛、張瑞森及劉正義。 1977 。臺灣結核菌素陽性反應乳牛之結核病原分離及鑑定。臺灣省家畜衛生試驗所報告，14：1—10。
2. 臺灣省政府農林廳。 1976 。動物用藥品管理手册。

3. 根本久、柚木弘之、○山英夫。 1965 。ツベルケリン製造法の検討。I.各種培地での培養成績。家衛試研究報告， 52 : 10—14。
4. 根本久、○山英夫、柚木弘之、近藤保夫、龜島英一。 1966 。ツベルケリン栽造法の検討，II Sauton 培地の再検討。家衛試研究報告， 53 : 14—17。
5. 根本久、○山英夫、柚木弘之、近藤保夫、龜島英一。 1968 。ツベルケリン製造法の検討，III 變法 Sauton 培地。 Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. No. 56, 20-22。
6. CHALOUX P. A. and . AF. RANNBy. 1970. Tuberculosis. In Gibbons W. J., E. J. Cat-cott and J. F. Smithcors. Eovine medicine and surgery. p. 165-170.
7. FRANCIS J., C. L. CHOI and A. J. FROST. 1973. The diagnosis of tuberculoss in cattle with special reference to biovine PPD tuberculin. Aust. Vet. J. 49 : 246-251.
8. KERR W. R., H. G. LAMOUNT and J. L. MCGIRR. 1946. Studies on tuberculin sensitivity in bovine. Vet. Rec. 58 : 443-451.
9. MAGNUSSON M., H. K. KIM ano M. W. B ENTZON. 1963. Tuberculin production. 1. Yield of tuberculo-protein from Aarious medium. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 58 : 363-375.
10. MERCHANT I. A. and R. A. PACKER. 1961. Mycobacobacterium. In Veterinary bacteriology and virology. 6ed. p. 571.
11. Laboratory methods in Veterinary Myc-obaeteriology. 1974. Veterinary Services Diagnostic laboratory. Animal and Plant Health Inspection Service U. S. Department of Agriculture, Ames, Iowa.
12, LESSLIE I. W., C. N. HEEERT, K. J. BuRN, B. N. MACCLANCY and W. J. C. DONNHLLV. 1975. Comparison of the specificity of human and qovine tuberculin PPD for testing cattle. 1. Republic of Ireland. Vet. Rec. 96. 332-334.
13. USDA. 1972. Statistical reporting service. USDA, 2-1 . Washington D. C.
14. VESTAL A. L. 1977. Procedures for isola-tion and identification of mycobacteria. H. E. W. Georgia, USA.
15. World Health Organization technical re-port services. 1968. No. 384. Requirements for tuberculins.

Studies on The Imdroveme nt of Application and Production of Bovine Tuberculin

Y. S. WU[1], HAPPY K. SHIEH[1], C. CHEN[1], J. S. LAI, C. C. LU, C. H. WANG[1], F. M. WU[2], and P, HUMMEL[3]

The sensitive potency of tuberculin prepared from Vallee strain of Germany-origin (Taiwan-vallee tubeculin) and Japanese strains (Lot # 39) routinely used in this laboratory were compared with that of German-made tuberculin in sensitized guinea pigs after passing the following tests ; sterility, safet y, nonirritation and nonsensitization tests. Higher concentraton of tuberculin , more than 50,000IU/ml, was obtained by using modified Europan mcdia for cultivation than using ciassical Sauton media.

Three kinds of tuberculin, lot # 39, Taiwan-Vallee and Germany-Vallee tuberculins were intradermally injected into the different sites of cervical area of 277 hcads of daily cow at farms in Tainan and and Chia-Yi counties, However, simultaneously lot # 39 tuberculin was additionally applied to the Caudal fdd as routine T. B. examination.

Seventy-three of tho 277 heads of cow were positive in the tuberculin test as determined by European standard (more than 2 mm swelling) . Among the 73 heads, only one cow was positive as determined by classical standard (more than 5 mm swelling) . The results of pathological examination, including gross and microscopic lesions, indicated that 29 out of the 73 tuberculin positive reactors had T. B. lesions. Twenty-five out of the 29 (86.2%) were in Germany-Vallee tuberculin test, whereas only 69% (20/29) in the other two tests.

1. Taiwan Provincial Rcsearch Institute for Anlmal Health.

2. Council for Agricultural Planning and Development, Excutive Yuen.

3. Visiting associate professor of National Taiwan University.