

30-6

假性結核棒狀桿菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) 菌膜上脂肪成份干擾結核菌素反應之探討

蕭終融* 陳素貞 吳義興 張惟茗 楊喜金

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 依照 Aebi 之方法萃取脂肪，並參考 Silva 及 Ioneda 之方法分析脂肪。經 4 次管柱式色層分析及 1 次薄層式色層分析後，於 Rf 值 0.4 及 0.17 處各呈現棕色小點。此 2 部分脂肪成份經鑑定為 Corynomycolic acid 及 1-Monopalmitin。經動物接種後，進行結核菌素反應之測試，發現此 2 部分脂肪成份均不會干擾結核菌素反應試驗。

關鍵詞：假性結核棒狀桿菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、結核菌素反應 (Tuberculin test)

緒言

乳羊假性結核棒狀桿菌，又稱羊棒狀桿菌 (*Corynebacterium ovis*)^(8,11)，引起乳山羊之乾酪樣淋巴腺炎 (Caseous lymphadenitis, CLA)，為一種慢性病，不易由臨床症狀觀察。本病是世界性分佈，而呂等於 1987 年在本省發現本病⁽¹⁾。

本病在山羊及綿羊的污染情形較分枝桿菌嚴重，且會引起結核菌素之偽陽性反應⁽⁵⁾。Shukla 等，早在 1971 年報告假性結核棒狀桿菌會在山羊及綿羊引起結核菌素之非特異性反應⁽⁹⁾。

Barksdale 亦曾指出，棒狀桿菌菌膜上之脂肪成份與分枝桿菌相似，均含有 mycolic acid⁽⁴⁾。

由蕭等試驗知，人工感染死菌或活菌之羊隻，均對結核菌素有腫脹反應，據此推論，菌膜上之成份為干擾結核菌素反應之主要因素⁽²⁾。

為究明假性結核棒狀桿菌菌膜上脂肪成份是否會干擾結核菌素反應，特進行本試驗。

材料與方法

1. 菌株之增菌培養：

將假性結核棒狀桿菌鈎置於 Brain heart infusion broth 內，共計分 16 批次進行增菌培養。每次 2,000 ml (分裝於 4 瓶 500 ml 血清瓶)，於 37 °C 振盪培養 2 天後，經 3,000 r.p.m. 遠心 30 分

鐘，去上清液。將沉渣經 120 °C 高壓滅菌 30 分鐘後，置於 45 °C 烤箱內，經 24 小時烘乾。將乾沉渣稱重。

2. 脂肪萃取：

依照 Aebi 之方法萃取脂肪：每 1 mg 乾菌量加入 0.1 ml 之乙醚-乙醇 (體積比 1:1) 混合液萃取，再經乙醚-丙酮 (體積比 1:3) 混合液萃取脂肪物質後，即可進行管柱式色層分析法及薄層式色層分析法。

3. 管柱式色層分析法及薄層式色層分析法：

管柱式色層分析法是將矽膠酸 (Silicic acid) 以氯仿裝載於 3 cm × 38 cm 之管柱中，即可進行脂肪分析。萃取液經濃縮成少量後，置於前述之管柱，各以 4 種不同之沖洗液 (量均為 230 ml)，各沖洗管柱 3 次。這 4 種沖洗液依次序分別為：

- (1) 1% (體積比) 乙醇溶於氯仿。
- (2) 10% (體積比) 甲醇溶於氯仿。
- (3) 50% (體積比) 甲醇溶於氯仿。
- (4) 甲醇。

蒐集 10% 甲醇溶於氯仿沖洗液第二次之沖出液，再進行管柱式色層分析法，1.8 cm × 48.5 cm 之管柱內盛載矽膠凝體 (Silica gel)，再分別各以 370 ml 之不同之沖洗液：正-己烷 (n-Hexane)、苯 (Benzene)、氯仿、10% (體積比) 甲醇溶於氯

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

仿、35% (體積比) 甲醇溶於氯仿、及甲醇。

蒐集 10% (體積比) 甲醇溶於氯仿及 35% (體積比) 甲醇溶於氯仿之沖出液。將兩者混合後，再通過矽膠酸之管柱式色層分析 (1.8 cm × 24 cm)。此次之矽膠酸先依序分別浸於氯仿、3% 及 10% (體積比) 甲醇溶於氯仿、及氯仿後裝載於管柱內，再分別各以 30 ml 之 3% (體積比) 之甲醇溶於氯仿為沖洗液，沖洗 6 次。蒐集第 4、5 及 6 次之沖出液，並匯集一起。

上述之匯集液再經矽膠凝體之管柱式色層分析 (1.5 cm × 20 cm)。依序以正-己烷、正-己烷/苯 (體積比 3:1 及 1:1)、苯、氯仿及氯仿/甲醇 (體積比 3:1)，各沖洗 3 次，每次 15 ml。

4. 純化脂肪：

蒐集正-己烷之第一次沖出液，進行薄層式色層分析法，以正-己烷/乙醚/醋酸溶液 (體積比 70:30:1) 為展開液，以碘噴霧為呈色劑。

不經呈色步驟，而在薄層式色層分析中呈色的相關位置處，將平板上矽膠凝體 (Silica gel) 刮下，浸入氯仿萃取液中。將試管用螺旋蓋旋緊，置於 50 °C 水浴中，萃取 4 小時。萃取後，經 3,000 rpm 遠心 30 分，取上清液，即可進行紅外光吸光度測定法。

由於萃取液具揮發性，置於室溫，待其揮發後，加入等量之甘油。此即為純化之脂肪物質，以供動物接種用。

5. 紅外光吸光度測定法：

將上述氯仿萃取液，配製成 10% 之適當濃度，注入貯液槽，選擇適當波長，即可進行紅外光吸光度測定法。將 Rf 值 0.4 處之脂肪成分進行紅外光吸光度測定法。

6. 動物接種試驗：

於北部某結核菌素反應陰性之乳羊場，分 5 組進行動物接種試驗，每組 6 頭乳山羊：

- (1) 陰性對照組 (空白對照組)：不接種任何物質。
- (2) 接種 Rf 值 0.4 處之成分：
- (3) 接種 Rf 值 0.17 處之成分：
- (4) 接種 Rf 值 0.4 處之成分 + 接種 Rf 值 0.17 處之成分：

(2)、(3)及(4)均以 2 ml 甘油 (每 ml 含 1 mg 之脂肪成分) 皮下接種於 6 頭實驗羊，隔 4 週再補強接種一次，於第 9 週進行結核菌素反應

測試。第 13 週再補強接種一次，第 18 週再度進行結核菌素反應測試。

(5) 陽性對照組 (人工接種死菌試驗)：

以本菌之死菌 (經 0.3% formalin 處理) 皮下各接種 2 ml (每 ml 含 1×10^9 菌量) 於 6 頭實驗羊，隔 4 週再補強接種一次，於第 9 週進行結核菌素反應測試。第 13 週再補強接種一次，於第 18 週再度進行結核菌素反應測試。

結果：

經 16 批次進行增菌培養，每次 2,000 ml (分裝於 4 瓶 500 ml 血清瓶)，振盪培養後，經 3,000 r.p.m. 遠心 30 分鐘，去上清液。將沉渣經 120 °C 高壓滅菌 30 分鐘後，置於 45 °C 烤箱內，經 24 小時烘乾沉渣稱重。共計有 3,600 mg 乾菌量。

依照 Aebi 之方法萃取脂肪：每 1 mg 乾菌量加入 0.1 ml 之乙醚-乙醇 (體積比 1:1) 混合液萃取，再經 360 ml 乙醚-丙酮 (體積比 1:3) 混合液萃取後，經適度濃縮後，脂肪萃取量共計有 150 ml。即可進行管柱式色層分析法及薄層式色層分析法。

經 4 次管柱式色層分析後，再經 1 次薄層式色層分析，於 Rf 值 0.4 及 0.17 處各呈現棕色小點。

重複進行 20 次薄層式色層分析之後，在呈色的相關位置處 (Rf 值 0.4 及 0.17)，將平板上矽膠凝體 (Silica gel) 刮下，浸入 200 ml 氯仿萃取液中。將試管用螺旋蓋旋緊，置於 50 °C 水浴中，萃取 4 小時。萃取後，經 3,000 rpm 遠心 30 分，取上清液。由於萃取液具揮發性，置於室溫，待其揮發後，稱重。總計各收集 72 mg (Rf 值 0.4) 及 66 mg (Rf 值 0.17) 之脂肪物質。將前者 12 mg 以氯仿配製成 10% 之適當濃度，即可進行紅外光吸光度測定法。其餘 60 mg 及 66 mg 之後者各加入 60 ml 及 66 ml 甘油，即為接種液。

將 Rf 值 0.40 處之脂肪物質經紅外光吸光度測定法，佑其吸光區有 4 處：

其吸光區在 2,800~2,900 cm^{-1} ，表示含有 CH_2 及 CH_3 。

其吸光區在 1,720 cm^{-1} ，表示含有 ester carbonyl。

其吸光區在 1,460 cm^{-1} ，表示含有 C-CH_2 。

其吸光區在 990~1,200 cm^{-1} ，表示含有醣類衍生物。

6 頭陰性對照組之實驗羊，在兩次之結核菌素反應測試時，均無腫脹反應。

3 組接種脂肪物質 (Rf 值 0.4 處、Rf 值 0.17 處及 Rf 值 0.4 處 + Rf 值 0.17 處) 之 18 頭實驗羊雖經

兩次（接種後第 4 週及第 13 週）之補強接種，但在兩次（接種後第 9 週及第 18 週）進行結核菌素反應測試時均無腫脹反應。

人工接種死菌組之 6 頭實驗羊亦經兩次之補強接種，而在兩次進行結核菌素反應測試時，均有 1.3 至 2.5 mm，之腫脹差等結果（如表 1 所示）。

表 1 6 頭人工接種死菌實驗羊之腫脹差測試之結果

編號 腫脹差(mm.)	1	2	3	4	5	6
接種後第9週	1.3	2.2	1.8	2.5	1.6	1.4
接種後第18週	1.8	1.5	1.4	2.2	1.9	2.0

討論

本試驗參考 Silva 及 Ionedá 之方法分析脂肪^(7,10)，最後經薄層式色層分析後，於 Rf 值 0.4 及 0.17 處各呈現棕色小點。依據 Silva 及 Ionedá 之報告得知 Rf 值 0.4 處之棕色小點即是 *Corynomycolic acid*，而 0.17 處之棕色小點則為 1-Monopalmitin。本試驗雖僅進行 Rf 值 0.4 處之脂肪物質之紅外光吸光度測定，但由其結果顯示，其吸光區計有 2800-2900、1720、1460、及 990-1,200 cm^{-1} 等 4 處，亦即分別表示其具有 CH_2 及 CH_3 、ester carbonyl、C- CH_2 及醣類衍生物等官能基，而這些官能基均為 mycolic acid 之基本構造，由此可間接佐證 Rf 值 0.4 處之脂肪物質為 mycolic acid。

3 組接種脂肪物質之 18 頭實驗羊雖經兩次之補強接種，但在兩次進行結核菌素反應測試時，均無腫脹反應。由此可知，假性結核桿狀桿菌菌膜上單純之脂肪物質，*Corynomycolic acid* 及 1-Monopalmitin 不會干擾結核菌素反應測試。此應由於脂肪物質之構造較簡單，較不具抗原性所致。同時，結核菌素反應測試所接種之物質為純化之結核菌蛋白質之衍生物，較不易受到脂肪物質之干擾。

6 頭人工接種死菌實驗羊於接種後第 9 週及接種後第 18 週所進行之兩次結核菌素反應測試，其腫脹差介於 1.3-2.5 mm 之產生，而陰性對照組則無明顯之腫脹差，由此可知，人工接種死菌會干擾結核菌素反應測試。由於僅接種死菌，接種物中僅含死菌體而不會引起其他之生物活性，亦即表示此干擾作用是由菌體成份所引起。

Barksdale 亦曾指出，棒狀桿菌菌膜上之脂肪成份與分枝桿菌相似，均含有 mycolic acid⁽⁴⁾。由於 mycolic acid 與其他物質以共價鍵或非共價鍵結合而

構成菌膜，並成為菌膜上之主要成分，且可成為許多非特異性或特異性之免疫調節器 (immunomodulator)，前者如：佐劑、mitogenic，及抗癌性而後者如分枝桿菌屬之 cord factor 等^(3,6)。但由本試驗結果顯示，單純之棒狀桿菌菌膜上之脂肪成份並不會干擾結核菌素反應測試，其干擾作用應由菌體或菌膜上之其他成份所引起，值得進一步探討。

參考文獻

1. 呂榮修、鄺懋勁、廖永剛、林地發、李永林、李全。*Corynebacterium pseudotuberculosis* 在臺灣發生的研究。台灣省畜牧獸醫學會報。49：45-53, 1987。
2. 蕭終融、楊敏雄、林士鈺。乳羊假性結核桿狀桿菌 (*Crynebacterium pseudotuberculosis*) 干擾結核菌素反應之探討：人工感染假性結核桿狀桿菌之乳羊對結核菌素反應之探討。八十一年度台灣省政府農林廳畜產試驗評議會。八十年試驗研究報告書。17-25, 1991。
3. Azuma, I., T. Taniyama, K. SAugimura, A.Q. A. Aladin and Y. Yamamura, Mitogenic activity of the cell walls of *Mycobacteria*, *Nocardiae* *Corynebacteria* and anaerobic coryneforms Japan. *J. Microbiol.*, 20: 263-271, 1976。
4. Barksdale, L. The genus *Corynebacterium*. In "The prokaryotes, Vol II" edited by M.P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A Balow, H. G. Schlegel. Springer-Verlag, New York pp.1827-1981.
5. Campbell, S. G., M. K. Sxhfaq, and J. J. Tashjian. Caseous lymphadenitis in goats in the U.S.A

- Proceeding 3rd International Conference on Goat Production and disease. Tucson Arizona pp. 449-454, 1982.
6. George P. Kubica and L. G. Wayne. The Mycobacteria-A sourcebook Part A chap 12. Marcel Dekker, INC. New York and Basel, 301-314, 1984.
 7. Ionedá, T. and C.L. Silva. Purification of 1-monoacylglycerols containing alpha-branched-beta-hydroxylated fatty acids from lipids of Corynebacterium pseudotuberculosis. Chemistry and Physics of Lipids 12 : 1089-1103, 1979.
 8. Jerald L. J., P. J. Brennan and S. K. Harris. Rapid identification of Mycobacterium bovis by a thin-layer chromatographic technique. A.J.V.R. 44 : 1920-1922, 1983.
 9. Shukla, R., N. Nath, and G. Singh. Observations on nonspecific reactions to tuberculin in sheep and goats with Corynebacterium ovis. Experientia 27 : 204-205, 1971.
 10. Silva, L. and T. Ionedá. Purification and characterization of nocardomycotoylglycerol from Nocardia rhodochrous. Chemistry and Physics of Lipids 20 : 217-233, 1977.
 11. William, C. S. F. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician 75 : 1165-1169, 1980.

The Studies on Interference in Tuberculin Test from the Lipid Components of Corynebacterium pseudotuberculosis in Milk Goat

*Shiau J. R., S. J. Chen, Y. S. Wu, W. M. Chang, S. C. Yang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.

SUMMARY According to Aeli's method of lipid extraction, and Silva's and Ionedá's method of lipid analysis, after 4 times of column chromatography and 1 time of thin-layer chromatography, 2 distinct spots found at the sites of Rf 0.4 and 0.17 were corynomycolic acid and 1-monopalmitin respectively.

After animal inoculation, 2 different lipid components, corynomycolic acid and 1-monopalmitin, could not act as the factors of the interference in tuberculin test on the inoculated milk goats.

Key words: Corynebacterium pseudotuberculosis, *Tuberculin* test.

*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.