

## 由結核菌素反應陽性牛隻分離副結核桿菌 ( *Mycobacterium paratuberculosis* )

呂榮修\* 鄺懋勁 蔡向榮 李永林 林地發  
廖永剛 林德田 曾俊憲

台灣省家畜衛生試驗所

**摘要** 為探討台灣牛隻副結核桿菌之感染情形，以各縣市送檢至本所之牛結核菌素反應陽性牛隻，採取 120 頭之腸系膜淋巴結供為細菌分離，結果從 2 頭陽性牛之腸系膜淋巴結分離到副結核桿菌，其中一頭同時有結核病病變並分離到牛結核桿菌，另外 1 頭則無可見結核病病變，亦未分離到結核桿菌。本文為台灣首次之牛副結核桿菌分離報告。

[\*呂榮修、鄺懋勁、蔡向榮、李永林、林地發、廖永剛、林德田、曾俊憲。由結核菌素反應陽性牛隻分離副結核桿菌，中華獸醫誌 19 (1): 38-43, 1993. \*聯絡人 TEL 02 621-2111 FAX 02 622-5345 ]

**關鍵詞：**副結核桿菌，結核菌素反應

### 緒言

副結核病 ( paratuberculosis ) 又稱 Johne's disease，係由副結核桿菌 ( *Mycobacterium paratuberculosis* ) 所引起牛及羊等反芻獸的一種慢性肉芽腫性腸炎，以間歇性下痢，漸進消瘦，腸管粘膜增厚和產生皺褶為特徵，本病在歐、美及日本等國家造成重大之經濟損失，因此有些國家如日本、澳洲、冰島及美國部分州把本病列入法定傳染病<sup>(9,14, 15,16)</sup>。

本省早在 1976 年即由呂等<sup>(1)</sup>對進口肉牛 2,907 頭進行補體結合 ( complement fixation, CF ) 試驗測試 CF 抗體，結果發現有 156 頭 ( 5.4 % ) 為陽性，呂等<sup>(2)</sup> 1987 年再以酵素結合免疫吸附法 ( enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA ) 調查 8 個縣市 1,003 頭牛，結果發現 35 頭 ( 3.5 % ) 為 ELISA 抗體陽性，但尚未有副結核桿菌之分離與鑑定的報告。

為探討台灣牛隻副結核桿菌感染情形，自 1986 年起陸續採取 120 頭結核菌素反應陽性牛隻之腸系膜淋巴結供為細菌分離，結果在 1987 年及 1991 年

分別分離到 1 株副結核桿菌，茲將有關之試驗成績報告如下：

### 材料與方法

**供試牛隻** 自 1986 年起利用送至本所剖檢之結核菌素陽性反應牛隻，共採取 120 頭之腸系膜淋巴結供為細菌分離之用。

**細菌分離** 供試牛採取空腸、盲腸及結腸等腸系膜淋巴結各約 10 公克，經製成乳劑後用紗布過濾，然後以 3,000 rpm 遠心 30 分鐘，沉渣加 0.6 % hexadecylpyridinium chloride ( HPC, Sigma ) 液 30 ml，放置 18~20 小時，取其 0.1 mL 分注於 3 支添加 Mycobactin J<sup>(13)</sup> 之 Herrold's egg-yolk medium<sup>(8)</sup> 並觀察 20 週。

**分離菌的鑑定** 分離的細菌以抗酸性染色及培養於添加 Mycobactin J 的 Herrold's egg-yolk medium 及不添加 Mycobactin J 的 Herrold's egg-yolk medium 做發育比較，呈抗酸性染色陽性，並能在

\* 抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌，19 (1): 38-43, 1993.  
台灣省家畜衛生試驗所

Mycobactin J 加 Herrold's medium 發育，而不會在無添加 Mycobactin 的 Herrold's medium 中發育，且發育時間超過 8~12 週以上者即屬副結核桿菌<sup>(15)</sup>。

**電子顯微鏡檢查** 副結核桿菌發育菌落以 1~2 mL 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer solution, PBS, pH7.4) 製成懸浮液後在紫外線下過夜照射，並添加 0.4% 福馬林液，在 37 °C 感作 2 個小時後，以 90,000 rpm 遠心 5 分鐘，取沉渣以 2% 磷鎢酸鉀負染色，在穿透式電子顯微鏡 (日立 H600 型) 下觀察菌體形態。

**田鼠人工感染試驗** 以市售健康田鼠 (hamster) 5 隻，分別經口或肌肉接種分離菌 407 株 0.2 mL ~ 0.5 mL ( $10^{6.5}$  CFU/mL)，4 個月後撲殺做病理學檢查及副結核桿菌之回收分離。病理學檢查除檢查各臟器之肉眼病變外，並採取各臟器以 10% 中性福馬林固定，再以石蠟包埋、切片、蘇木紫及伊紅 (Hematoxylin & Eosin, HE) 染色後鏡檢組織病變。副結核桿菌之分離則依上述之方法實施。撲殺田鼠時並採取血清測定副結核桿菌的補體結合抗體力價。

**補體結合試驗** 測定方法如前所述<sup>(2)</sup>，即供試血清非活化後，與 2 單位補體及 4 單位抗原在 4 °C 過夜感作後，以呈現 50% 或以上阻止溶血現象之稀釋倍數為 CF 抗體力價。

## 結果

**結核菌素反應陽性牛之檢驗與副結核桿菌的分離** 從 120 頭結核菌素反應陽性牛，在撲殺時採取空腸、盲腸、結腸等腸系膜淋巴結，經製成乳劑後接種於添加有 Mycobactin J 之 Herrold's egg-yolk medium，結果 1987 年自 407 號及 1991 年自 397 號

結核菌素反應陽性牛腸系膜淋巴結乳劑，二者皆經過約 4 個月培養後始分離到副結核桿菌，其餘均為培養陰性。

分離副結核桿菌牛 No.407 為屏東縣李氏所飼養的 5 歲齡乳牛，結核菌素皮內反應腫脹差為 14.9 mm，於 1986 年 11 月 28 日撲殺，剖檢病變可見肺膈葉尖端有 1 個 7×4×3 cm 大之硬實結節，切開內含黃色化膿樣病灶。後縱膈淋巴節腫大 12×2×1 cm，含數個 0.3~0.4 cm 大之乾酪樣結節。細菌分離結果除分離到牛結核桿菌 (*M. bovis*) 外，經過 4 個月的培養亦分離到副結核桿菌 (*M. paratuberculosis*)。

分離副結核桿菌之牛 No.397 係高雄縣燕巢鄉溫姓酪農戶在 1990 年 8 月自屏東縣購入之 2 歲齡乳牛，結核菌素檢驗呈陽性反應，1990 年 12 月 18 日撲殺，剖檢時未發現可見結核病病變，腸系膜淋巴結以上述方法培養 15 週後始分離到副結核桿菌，但並未分離到牛結核桿菌。

由 No.407 及 No.397 結核菌素反應陽性牛隻所分離的菌株，經抗酸性染色為抗酸性陽性。經接種於添加 Mycobactin J 的 Herrold's egg-yolk medium 其發育為陽性，呈為直徑 1~2 mm 的白色菌落 (圖 1) 而接種於無添加 Mycobactin 的 Herrold's egg-yolk medium 則發育為陰性，顯示分離菌株需要 Mycobactin，分離菌株在電子顯微鏡下呈為無鞭毛，無莢膜之桿菌 (圖 2)，本菌株經送日本家畜衛生試驗場結核菌素研究室鑑定結果亦鑑定為副結核桿菌。

**分離菌對實驗動物的病原性** 分離菌 407 株以 0.2 mL ( $10^{6.5}$  CFU/mL) 接種於田鼠肌肉 2 頭，0.5 mL 口服 3 頭，經 4 個月後撲殺，結果自脾、肝、淋巴結等部位，於培養 36~72 日分離到該接種細菌，並有 32~128 倍的補體結合體力價，但病理學檢查並未見有肉眼病變或顯微病變 (表 1)。

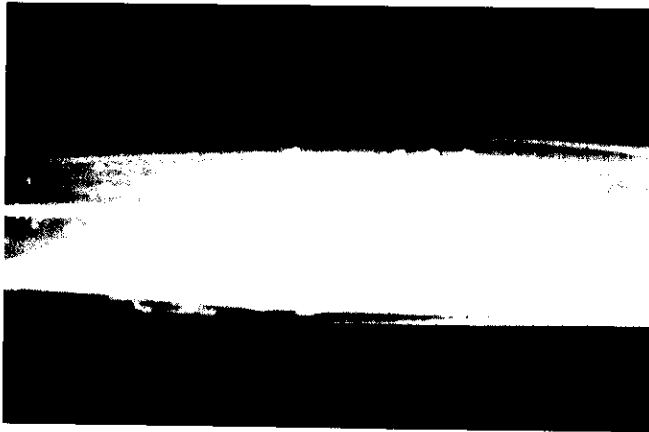


圖 1 副結核菌在添加有 Mycobactin 的 Heroid's egg-yolk medium 形成直徑 1~2 mm 的白色突起菌落

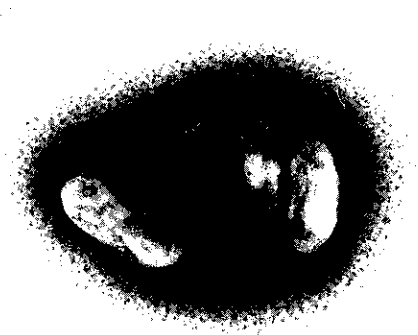


圖 2 副結核桿菌之電子顯微鏡像，×16,000

表 1 副結核桿菌分離株 407 株人工接種田鼠成績<sup>1a</sup>

接種田鼠	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
接種途徑	經 □	經 □	經 □	肌肉	肌肉
接種劑量( $10^{6.5}$ CFU/mL)	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.2 mL	0.2 mL
分離部位					
肺	-	-	-	-	-
肝	-	-	+	-	-
腎	-	-	-	-	-
脾	-	+	+	+	+
腦	-	-	-	-	-
頤下淋巴結	-	+	-	-	-
頸淋巴結	-	-	-	-	-
腸淋巴結	+	+	+	+	+
鼠蹊淋巴結	-	-	-	+	-
小腸	-	-	-	-	-
大腸	-	-	-	-	-
盲腸	-	-	-	-	-
胸腺	-	+	+	-	-
補體結合					
抗體力價	33 <sup>b</sup>	64	128	32	64
肉眼病變	-	-	-	-	-
組織病變	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> 接種 4 個月後撲殺檢查肉眼及組織病理變化，測定血清補體結合抗體力價，並由各臟器培養分離副結核桿菌

<sup>b</sup> 血清稀釋倍數

## 討論

飼養於台灣之牛隻雖然早在 1976 年即已發現有副結核病抗體存在<sup>(1)</sup>，但是一直未有臨床病例及細菌分離報告，為了探討台灣之牛隻副結核桿菌感染情形，自 1986 年起陸續採取 120 頭結核菌素反應陽性牛隻之腸系膜淋巴結，以 Herrold's egg-yolk medium 添加副結核桿菌發育所必需之 mycobactin J 培養，結果分離到 2 株副結核桿菌，此係本省首次之牛副結核桿菌分離報告。

副結核桿菌之發育非常緩慢，往往需時數個月之久<sup>(4)</sup>。雖然可由糞便或腸粘膜等直接作塗抹片及抗酸性染色檢查菌體，但是此法之檢出率及特异性並不佳。據 Carter<sup>(5)</sup>報告直腸塗抹片平均只能檢出 25% 的感染牛隻，而在牛糞便中常有許多腐生性 (saprophytic) 抗酸菌形態無法與副結核桿菌區分<sup>(5,15)</sup>，血清學診斷方法如免疫酵素吸附法、補體結合試驗、瓊脂免疫擴散法 (agar gel immunodiffusion, AGID) 等，雖然可以在短時間內完成試驗，但是由於偽陽性反應及偽陰性反應的存在仍需靠副結核桿菌的分離來確診<sup>(5,6,11,15)</sup>。而副結核桿菌的鑑定，由於其生化活性差，因此往往以培養特性 (生長緩慢，Mycobactin 依賴性) 及形態 (短小抗酸性染色桿菌) 來鑑定<sup>(15)</sup>，展望將來可發展聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 等方法來迅速檢出副結核桿菌。

牛隻經結核菌素檢查呈陽性反應後，經剖檢有時並不能發現可見之結核病肉眼病變，其原因除了感染初期病灶仍太小而無法以肉眼察覺外，牛隻感染其他分枝桿菌屬菌株如副結核桿菌所引起的交叉反應亦有可能<sup>(1,4)</sup>。因此在本研究中針對 120 頭結核菌素陽性反應牛隻來進行副結核桿菌之分離，結果由 2 頭 (1.6%) 分離到副結核桿菌，雖然比例不高，但值得注意的是其中一頭並未有可見之結核病病變亦未分離到結核菌，因此牛隻因感染副結核桿菌而引起結核菌素反應陽性的可能性並不能排除。

典型的副結核病病牛在臨床上會有頑固性間歇性下痢及漸進性消瘦，剖檢時在腸管可見粘膜增厚及產生皺褶為特徵<sup>(9,14,15,16)</sup>。在台灣雖然早就證明有抗體存在<sup>(1,2)</sup>，並且此次亦分離到病菌，但目前為止並未見有臨床病例報告，此次 2 頭分離到副結核菌之牛隻也並未見有副結核病的病變。因於本病係一種慢性、漸進性疾病，牛隻感染本潛伏期可長達兩年，而典型病變亦須至末期才會呈現，另外感染牛隻在臨床上並不一定會有症狀產生，據報告在 20 頭

感染牛隻中大約只有 1 頭會產生明顯的臨床症狀<sup>(16)</sup>，因此此 2 頭分離到副結核桿菌之牛隻，可能尚在潛伏期間或為不顯性感染牛隻。本省雖尚無臨床病例報告，但是牛隻不顯性感染副結核病仍可造成重大經濟損失。據 Buergelt<sup>(4)</sup> 調查不顯性感染牛隻，發現其產乳量低於未感染牛隻達 8~9%，這些不顯性感染牛隻乳房炎及不妊的問題亦較未感染牛隻高出 4~5 倍，因此有顯著的高淘汰率，因而在潛在育種價值的損失十分鉅大，甚至認為不顯性感染所造成的經濟損失比可見之臨床病例還嚴重<sup>(4,12)</sup>。所以本省雖尚未見有臨床病例，對本病之防疫仍需加以重視。

副結核桿菌的抗原性與鳥結核桿菌 (*M. avium*) 相近，二者之間有許多共同抗原<sup>(5,7,15)</sup>，但副結核桿菌主要係感染牛、水牛、綿羊、山羊及鹿等反芻獸，其他如馬、豬、猴亦可人工感染，其中豬並被認為為本菌可能之中間宿主<sup>(5,7,10,15)</sup>。在鳥類則只有在歐洲常在珠頸斑鳩 (wood pigeons) 分離到一種類似之細菌，此菌亦為 Mycobactin 依賴性，在人工感染牛隻會引起類似副結核病的漸進性感染，但是此菌與副結核桿菌有不同的藥劑敏感性<sup>(14)</sup>，本省養鴿風氣頗盛，且鴿子自由飛翔於各牧場之間，如會感染並排出副結核桿菌則對本病的傳播十分重要，因此對於此點應加以究明。

**誌謝** 本報告之完成多蒙日本農林水產省家畜衛生試驗場生物活性物質研究室橫溝祐一博士授贈 Mycobactin J 及分離菌之鑑定等，又本所黎南榮研究員、呂蓮葉小姐協助拍攝電子顯微鏡照片，謹致謝忱。

## 參考文獻

1. 呂榮修、李永林、黎南榮、黃士則、林榮福、鄭建盛、邱朝齊、陳守仕，進口牛之胸膜性肺炎、布氏桿菌、牛副結核病之抗體調查，中華獸誌 2: 72-75, 1976。
2. 呂榮修、蔡向榮、鄺懋勁、賴淑雅、李永林、林地發、李全。以酵素結合免疫吸附法調查台灣牛副結核病抗體，中華獸誌 13: 11-15, 1987。
3. Amdtutz HE. Bovine Paratuberculosis: An update. Mod Vet Pract 65: 134-135, 1984。
4. Buergelt CD, Duncan JR. Age and milk production data on cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. JAVMA 173: 478-480, 1978。

5. Carter GR. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. 3rd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 190-192, 1986 °
6. Goudswaard J, Gilmour NJL, Dijkstra TG, Van Beek JJ. Diagnosis of Johne's disease in cattle : A comparison of five serological tests under field conditions. Vet Rec 98 : 461-462, 1976 °
7. Gunnarsson E, Fodstad FH. Analysis of antigens in Mycobacterium paratuberculosis. Acta Vet Scand 20 : 200-215, 1979 °
8. Herrold RD. Egg yolk medium for the growth of tubercle bacill : J Infect Dis 48 : 236-241, 1931 °
9. Julian RJ. A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. Canad Vet Jour, 16 : 33-43, 1975 °
10. Kaiga M, Yosiruma T, Matayosi S, Maiu Dawa T, Kuniba Y, Yasutaniya Y. The paratuberculosis in cerrus nippon. Abst 112nd Annul Meet Jap Soc Vet Sci, 1991 °
11. Merkal RS, Larsen AB, Kopecky K E., Ness RD. Comparison of examinatin and test methods for early detectiion of paratuberculous cattle. Am J Vet Res 29 : 1533-1538, 1968 °
12. Merkal RS, Larsen AB, Booth GD. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. Am J Vet Res 36 : 837-838, 1975 °
13. Merkal RS, Mccullough WG. A new mycobactin, mycobactin J from Mycobacterium paratuberculosis. Curr Microbiol 7 : 333-336, 1982 °
14. Merkal RS. Paratuberculosis : Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. J Am Vet Med Assoc 184 : 939-943, 1984.
15. Timoney JF, Gillespie JH, Scott F W, Barloughy JE. Hagan and Burner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animal, 8th ed., Cornell University Press, Ithaca and London, 280-285, 1988 °
16. Yokomizo Y. Paratuberculosis of cattle. J Jap Vet Med Assoc 38 : 489-495, 1985 °

## Isolation of *Mycobacterium Paratuberculosis* from Tuberculin Test Reactors

\* Yong-Siu Lu, Mau-Jinn Kwang, Hsiang-Jung Tsai,  
Yong-Lin Lee, Dih-Fa Lin, Yung-Kung Liao,  
Der-Tyan Lin, and Chun-Shein Tseng

Taiwan provincial Research Institute for Animal Health, Tansui Taiwan 251, R.O.C

**SUMMARY** The mesenteric lymph nodes of 120 tuberculin test reactors were cultured. Two strains of *Mycobacterium parauberculosis* were isolated and identified. One strain was isolated from a cow with visible tubercular lesions and *M. bovis* was isolated from the same cow. The other strain was isolated from a cow without visible tubercular lesion and no other bacterium was isolated from this cow. There is no previous report of the isolation and identification of *M. paratuberculosis* in Taiwan. [\*Lu YS, Kwang MJ, Tsai HJ, LEE YL, Liao YK, Lin DT, Tseng CS. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from tuberculin test reactors. J Chin Soc Vet Sci 19(1): 38-43, 1993. \*Corresponding author TEL 02-621 2111, FAX 02-622 5345].

**Keywords:** *Mycobacterium paratuberculosis*, Tuberculin test Reactors.