

人工感染假性結核棒狀桿菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) 之乳羊對結核菌素反應之探討

蕭終融 楊敏雄 林士鈺 林文華

台灣省家畜衛生試驗所

以10頭接種經0.3% formalin 處理之假性結核棒狀桿菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) 及2頭接種活菌 (1×10^8 /ml, 2 ml/頭) 實驗羊, 各進行兩次結核菌素反應試驗, 其腫脹差與3例自然感染羊之腫脹差相比較, 經 t- 試驗之統計分析, 發現自然感染病羊及活菌接種羊經18週後, 其腫脹差有較明顯之差異 ($P < 0.05$), 亦即表示前二者對結核菌素干擾作用遠大於死菌接種羊所引起之干擾作用。

剖檢2頭人工接種死菌實驗羊, 其結核菌分離均呈陰性反應, 但亦會產生腫脹差, 表示假性結核棒狀桿菌之菌體即會干擾結核菌素反應。

乳羊假性結核棒狀桿菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) 又稱羊棒狀桿菌 (*Corynebacterium ovis*), 引起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⁽¹⁾於1987年在本省亦發現本病。

Shukla⁽⁴⁾等早於1971年報告假性結核棒狀桿菌會在山羊與綿羊引起結核菌素的非特异性反應。呂等亦於1987年於本省, 由結核菌素反應陽性羊的病例中, 分離5株本病。

Barksdale⁽²⁾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。

本菌在山羊及綿羊的污染情形較分枝桿菌嚴重^(3,5), 且會干擾結核菌素反應, 為究明其機序及在本省的污染情形, 特進行本實驗。

本實驗以人工接種死菌及活菌於山羊後, 並於接種後第9週及第18週進行結核菌素皮內反應測試, 以瞭解其腫脹差之情形, 並與自然感染病例之腫脹差比較。這些腫脹差, 均經生物統計分析, 比較相互之間的差異性。

材料與方法

材 料:

(一)自然感染病例羊3例:

由各地家畜疾病防治所代為蒐購結核菌素反應陽性羊39頭中經結核菌素反應之再測試試驗後進行剖檢, 取病材分離病原後, 確診為假性結核棒狀桿菌感染者計3例。

(二)人工接種活菌實驗羊2頭:

由台南縣某乳羊結核病清淨場購回2頭結核菌素反應陰性羊, 於本所進行人工接種活菌試驗。

(三)人工接種死菌實驗羊10頭:

於新竹縣某乳羊結核病清淨場選定 10 頭結核菌素反應陰性羊 (6 月齡閹公羊)，進行人工接種死菌試驗。

(四) 陰性對照組：

於新竹縣與(三)同一牧場，另選 2 頭結核菌素反應陰性羊做為本實驗之陰性對照組。

方 法：

(一) 人工接種活菌試驗：

假性結核棒狀桿菌於 Brain Heart Infusion Broth 增菌後，以 1×10^8 / ml 之菌液 1 ml 肌肉接種於 2 頭實驗羊，感染前及感染後每隔 2 週採血一次。並於接種後第 9 週及第 18 週進行結核菌素反應測試。實驗完畢後進行剖檢及細菌分離。

(二) 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 於 10 頭實驗羊 (每 ml 含 1×10^9 菌量) 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。實驗完畢後，剖檢 2 頭，進行細菌分離。

(三) 結核菌素皮內反應測試：

(A) 3 例自然感染病例羊，於購回後第 8 週進行牛型結核菌素再測試。接種 1 劑量牛型結核菌素 (Coopers Animal Health Inc. Lot. No. 538) 於頸側部。接種後 72 小時測其腫脹差。

(B) 人工接種死菌或活菌實驗羊及陰性對照組：依上述方法於接種後第 9 週及第 18 週進行牛型結核菌素反應測試。

(四) 血清測試：

(A) 3 例自然感染病例羊，於購回 8 週時，進行結核菌素反應之再測試後，剖檢取病材並採血清。

(B) 2 頭人工接種活菌實驗羊，於接種前及接種後每隔 2 週採血一次至第 18 週。

(C) 10 頭人工接種死菌實驗羊及 2 頭對照組實驗羊，於接種前及接種後第 2 週、第 6 週、第 9 週、第 13 週及第 18 週各採血一次。

所有血清樣本，均採用呂等⁽¹⁾之方法

，以本菌之外毒素為凝膠沈澱法 (AGP) 抗原，進行 AGP 試驗，以檢測血清中是否含有抗外毒素之抗體。

(五) 統計學分析：腫脹差數據採用 t-test (t-試驗) 進行比較分析：

結 果

3 例自然感染病例羊，於購回第 8 週進行結核菌素反應之再測試，其腫脹差分別為 5.2, 4.5, 3.6 mm，各自與防治所所測之原來腫脹差不同 (分別為 7.5, 6.2, 5.6 mm)，測試完後進行剖檢，發現 A、C 例在咽背淋巴，B 例在左支氣管淋巴及縱膈淋巴均有乾酪樣壞死或化膿灶之病變。病原分離均為假性結核棒狀桿菌之感染。結核菌之分離則均為陰性反應，血清均呈 AGP 抗毒素陽性反應，如表 1 所示。

2 例人工接種活菌實驗羊，於接種後第 9 週及第 18 週進行結核菌素反應測試，其腫脹差如表 2 所示，分別為 3.3 及 4.2 mm, 3.8 及 3.6 mm，自接種後 2 週起至第 18 週止，每隔 2 週採血一次，2 例實驗羊之 9 次血清樣本經 AGP 抗外毒素之測試，結果均為陽性反應，但在接種前則呈現陰性反應 (如表 2 所示)。經剖檢後，D 例在咽背淋巴，E 例在縱膈淋巴，均可見到化膿病灶。病原分離均為假性結核棒狀桿菌感染，而結核菌之分離則呈陰性反應。

10 例人工接種死菌實驗羊，於接種後第 9 週及第 18 週進行結核菌素測試，其腫脹差分別為 1.6, 3.4, 2.8, 3.6, 0.8, 1.5, 4.1, 2.6, 3.5 和 2.5 mm 及 1.2, 3.0, 2.2, 2.5, 1.4, 1.6, 2.6, 2.0, 1.8 和 2.2 mm (如表 3 所示)。10 頭實驗羊各採 6 次血清樣本，經 AGP 測試，均為陰性反應。剖檢其中 2 頭，無可見之肉眼病灶。病原分離均呈陰性反應。

2 例陰性對照實驗羊之血清樣本均呈陰性反應，腫脹差亦無明顯之變化。

實驗中之腫脹差均經 t-test (t-試驗) 進行統計學上之分析，其結果如下：

3 例自然感染病例羊，原來腫脹差 7.5,

6.2, 5.6 mm 與再測試腫脹差 5.2, 4.5 及 3.6 mm 之間, 其 t 值為 2.75009, 其差異不顯著 [$t (\frac{0.05}{df 4}) = 2.776$, $t (\frac{0.01}{df 4}) = 4.607$]。

2 例人工接種活菌實驗羊接種後第 9 週之腫脹差 3.3 及 4.2 mm 與接種後第 18 週之腫脹差 3.8 及 3.6 mm 之間, 其 t 值為 0.1085, 差異不顯著。 [$t (\frac{0.05}{df 2}) = 4.303$, $t (\frac{0.01}{df 2}) = 9.925$]。

10 例人工接種死菌實驗羊, 接種後第 9 週之腫脹差分別為 1.6, 3.4, 2.8, 3.6, 0.8, 1.5, 4.1, 2.6, 3.5 及 2.5 mm 與接種後第 18 週之腫脹差 1.2, 3.0, 2.2, 2.5, 1.4, 1.6, 2.6, 2.0, 1.8 及 2.2 mm 之間, 其 t 值為 1.549, 差異不顯著。

[$t (\frac{0.05}{df 18}) = 2.101$, $t (\frac{0.01}{df 18}) = 2.878$]

接種後第 9 週進行結核菌反應之腫脹差, 2 頭人工接種活菌實驗羊為 3.3 及 4.2 mm 與 10 頭人工接種死菌實驗羊之腫脹差分別為 1.6, 3.4, 2.8, 3.6, 0.8, 1.5, 4.1, 2.6, 3.5 及 2.5 mm 之間其 t 值為 1.39258, 差異不明顯。 [$t (\frac{0.05}{df 10}) = 2.228$, $t (\frac{0.01}{df 10}) = 3.169$]。

接種後第 18 週之腫脹差, 上述兩組之腫脹差分別為 3.8 及 3.6 mm 和 1.2, 3.0, 2.2, 2.5, 1.4, 1.6, 2.6, 2.0, 1.8 和 2.2 mm, 其 t 值為 3.965845, 差異極為顯著。

[$t (\frac{0.05}{df 10}) = 2.228$, $t (\frac{0.01}{df 10}) = 3.169$]

將 3 例自然感染病例羊再測試之腫脹差, 5.2, 4.5 及 3.6 mm 分別與 2 頭人工接種活菌實驗羊的兩次腫脹差及 10 頭人工接種死菌實驗羊的兩次腫脹差, 進行 t -test 其結果如下:

3 例自然感染病例羊再測試之腫脹差與 2 頭人工接種活菌實驗羊接種後第 9 週之腫脹差之間, 其 t 值為 0.9968, 差異不顯著。

[$t (\frac{0.05}{df 3}) = 3.182$, $t (\frac{0.01}{df 3}) = 5.841$]

其與 2 頭人工接種活菌實驗羊接種後第 18 週之腫脹差之間, 其 t 值為 1.2172, 差異不顯著。

其與 10 頭人工接種死菌實驗羊接種後第 9 週之腫脹差之間, 其 t 值為 2.6678, 差異顯著。 [$t (\frac{0.05}{df 11}) = 2.201$, $t (\frac{0.01}{df 11}) = 3.106$]。

其與 10 頭人工接種死菌實驗羊接種後第 18 週之腫脹差之間, 其 t 值為 5.8933, 差異極為顯著。

表 1 3 例自然感染假性結核棒狀桿菌病例羊之腫脹差、肉眼病灶、病原分離及 AGP 血清測試之結果

編號	原來腫脹差 (mm)	再測試腫脹差 (mm)	肉眼病灶	病原分離	結核菌之分離	AGP 血清測試
A	7.5	5.2	+	假性結核棒狀桿菌	-	+
B	6.2	4.5	+	假性結核棒狀桿菌	-	+
C	5.6	3.6	+	假性結核棒狀桿菌	-	+

表 2 2 例人工接種活菌實驗羊之腫脹差、肉眼病灶、病原分離及 A G P 血清測試之結果

編號	腫脹差 (mm)		肉眼病灶	病原分離	結核菌之 分 離	A G P 血清測試	
	接種後 第 9 週	接種後 第 18 週				接種前	接種後 *
D	3.3	3.8	+	假性結核 棒狀桿菌	-	-	+
E	4.2	3.6	+	假性結核 棒狀桿菌	-	-	+

* 2 例人工接種活菌實驗羊，於接種後第 2 週始至第 18 週各計採血清 9 次，自第 2 週起，9 次血清樣本均為 A G P 陽性反應。

表 3 10 例人工接種死菌實驗羊之腫脹差、肉眼病灶、病原分離及 A G P 血清測試之結果

編號	腫脹差 (mm)		肉眼 病 灶	病 原 分 離	A G P 血 清 測 試					
	接種後 第 9 週	接種後 第 18 週			接種前	接種後 第 2 週	第 6 週	第 9 週	第 13 週	第 18 週
1	1.6	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3.4	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2.8	2.2	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
4	3.6	2.5	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
5	0.8	1.4	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
6	1.5	1.6	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
7	4.1	2.6	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
8	2.6	2.0	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
9	3.5	1.8	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-
10	2.5	2.2	N.D	N.D	-	-	-	-	-	-

討 論

本實驗原先計畫對天竺鼠亦行人工接種死菌及活菌之試驗，由於無天竺鼠自然感染病例做為參考，而乳山羊則有自然感染病例可做為腫脹差比較之參考。且前年進行預備試驗，發現人工接種死菌的實驗羊，亦有干擾結核菌素反應之現象。故僅進行人工接種活菌及死菌於乳山羊之試驗。

由表 1，病原分離及 A G P 血清測試中，可確認 3 例自然感染病例羊為假性結核棒狀桿菌之感染。於本所進行結核菌素再測試試驗所測得之腫脹差 5.2，4.5 及 3.6 mm 與防治所所測得之腫脹差 7.5，6.2 及 5.6 mm 不同，經 t- 試驗統計分析，發現其間差異雖不顯著，但若以其數據與暫行乳山羊結核菌素反應判定標準相較，再測試實驗中，僅有 1 頭列為結核病羊，另 2 頭則為疑陽性病羊，其判定結果

則大不相同。

呂等⁽¹⁾報告中亦進行人工接種活菌試驗採靜脈注射及肌肉注射兩種不同方法，其中採用靜脈接種實驗僅存活 35 天，而後者存活 180 天。為順利進行本試驗，本試驗人工接種活菌之試驗，採用肌肉注射。由表 2 病原之分離回收，及接種後第 2 週起即可測得抗 A G P 外毒素抗原之抗體，表示人工接種試驗成功。於接種後第 9 週及第 18 週所進行兩次結核菌素反應所測得之腫脹差之間，及此兩次分別與 3 例自然感染病羊之結核菌素反應再測試之腫脹差比較，經 t- 試驗統計分析，知其差異不顯著，亦即表示由人工接種活菌實驗羊組所引起之兩次結核菌素之干擾情形與自然感染病例無異。

10 例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，由其腫脹差之產生（陰性對照組即無明顯之腫脹差），知其有干擾結核菌素反應之情形存在。由於僅接種死菌，且由 A G P 血清測試中，知其均為陰性反應，即表示接種物中不會引起其他之生物活性（Biological actioity）如抗外毒素抗體之產生等，而僅含菌體成分，亦即表示干擾作用僅由菌體成份所引起。Barksdale⁽²⁾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. mycolic acid 是否會干擾結核菌素反應？尚待進一步之探討。而將其兩次腫脹差與 3 例自然感染例之再測試腫脹差比較。接種後第 9 週之腫脹差與後者相較，其差異顯著（ $P < 0.05$ ），而接種後第 18 週之腫脹差與後者相較，其差異極為顯著（ $P < 0.01$ ）。表示接種死菌所引起之干擾作用，遠小於自然感染例。而其接種後第 9 週之腫脹差，與同樣接種後第 9 週之接種活菌組之腫脹差比較，其差異不顯著，但於接種後第 18 週，兩者之間，其差異顯著（ $P < 0.05$ ）。由此可知自然感染病例及接種後經較長時間（第 18 週）之後，所引起對結核菌素反應之干擾作用，遠大於由接種死菌所引起之干擾作用，是否由於菌量之多寡有異？抑或有其他生物活性相助？均尚待進一步之研究。

本實驗中所有實驗羊之結核菌分離均為陰

性反應，表示其腫脹差之產生，均由假性結核棒狀桿菌（不管是自然感染或接種死菌或活菌）所引起，足以證實假性結核棒狀桿菌之感染，的確會干擾結核菌素反應。且長期之活菌感染（包括自然感染及人工接種）所引起之干擾作用，遠大於接種死菌所引起的。

參考文獻

1. 呂榮修、鄭懋勁、廖永剛、林地發、李永林、李全。1987。Corynebacterium pseudotuberculosis 在台灣發生的研究，台灣省畜牧獸醫學會會報 49: 45-53。
1. Barksdale, L. 1981. The genus Corynebacterium. In "The prokaryotes. Vol II" edited by M.P. Starr, H. Stol P.H.G. Truper, A Balows, H.G. Schlegel. Springer-Verlag. New York pp. 1827- 1839.
3. Campbell, S.G. M.K. Ashfaq and J.J. Tashjian, 1982. Caseous lymphadenitis in goats in the U.S.A. Proceedings 3rd International Conference on Goat Production and Disease. Tucson Arizona pp 449-454.
4. Shukla, R., N. Nath, and G. Singh, 1971. Observations on nonspecific reactions to tuberculin in sheep and goats with Corynebacterium ovis. Experientia 27: 204-205.
5. Williams, C.S.F. 1980. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician 75: 1165-1169.

The Studies on Interference of Tuberculin Test in Milk Goat Artificially Inoculated with Corynebacterium pseudotuberculosis

Shiau J.R., M.S. Yang and S.Y. Lin, W.H. Lin.

SUMMARY

Two tuberculin tests were performed in 12 artificially inoculated milk goats; 10 milk goats were inoculated with killed Corynebacterium pseudotuberculosis treated by 0.3% formalin and 2 were inoculated with 2ml live bacteria (1×10^8 C.F. U/ml).

The increases in skin thickness from 12 artificially inoculated milk goats were compared with those from 3 naturally infected milk goats by statistical t-test. Very significant difference in increase in skin thickness was found between 3 natural infections and 10 artificial killed bacteria inoculations ($P < 0.01$), and the difference between 10 milk goats inoculated with killed bacteria and 2 inoculated with live bacteria at 18th week postinoculation was also significant ($P < 0.05$).

The results indicated the interference of tuberculin test from 3 naturally infected milk goats and 2 infected with live bacteria was stronger than that from the 10 inoculated with killed bacteria.

The increase in skin thickness of tuberculin test in 2 milk goats, free from Mycobacterium infection, inoculated with killed Corynebacterium pseudotuberculosis indicated that only whole cells of Corynebacterium pseudotuberculosis could interfere tuberculin test.