

# Corynebacterium pseudotuberculosis 在台灣發生的研究

呂榮修 鄭懋勁 廖永剛 林地發 李永林 李 全

## 台灣省家畜衛生試驗所

調查本省 1986 至 1987 年 8 個結核菌素反應陽性山羊之病例，結果分離到 *Corynebacterium pseudotuberculosis* 5 株與 *Mycobacterium bovis* 2 株。

以 *C. pseudotuberculosis* 外毒素製備凝膠沈澱法抗原，並以此抗原調查 1987 年野外山羊 265 頭與 1982 年本省結核菌素反應陽性牛 105 頭，結果發現陽性山羊 30 頭，陽性率 11.3%，結核菌素反應陽性牛之 *C. pseudotuberculosis* 亦呈陽性者 10 頭，陽性率 9.5%。

以 Kirby-Bauer 法測定所分離 5 株 *C. pseudotuberculosis* 之抗生素感受性，結果均呈一致，並分別對 Ampicillin (10  $\mu$ g) Bacitracin (10  $\mu$ ) Chloramphenicol (30  $\mu$ g) Doxycycline (30  $\mu$ g) Erythromycin (15  $\mu$ g) Lincomycin (2  $\mu$ g) Tetracycline (5  $\mu$ g) Sulfamethoxazol-Trimethoprim (23.75  $\mu$ g, 1.25  $\mu$ g) 有感受性。

乾酪樣淋巴腺炎 (Caseous lymphadenitis, CLA) 係由 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (又稱 *Corynebacterium movis*) 所引起之山羊疾病，本病呈世界性分佈，而本省至今未有病例與相關之研究報告，在 1986 至 1987 年山羊肺結核之研究調查同時，發現了本病，從 8 個臨床結核菌素反應陽性之山羊，分離到 *C. pseudotuberculosis* 5 株與 *Mycobacterium bovis* 2 株，Shukla 等 (1) 亦早於 1971 年報告 *C. pseudotuberculosis* 會在山羊與綿羊引起結核菌素的非特異性反應，本次試驗在調查結核菌素反應陽性山羊之病例比較分析，對 *C. pseudotuberculosis* 分離株之生化性狀鑑定，同時調查 1987 年本省野外山羊與 1982 年結核菌素反應陽性牛之 *C. pseudotuberculosis* 抗體，以檢討 *C. pseudotuberculosis* 對結核菌素試驗的影響。

## 材料與方法

### 一、山羊病材：

係 1986 至 1987 年在本省花蓮縣、桃園縣、台北縣、新竹縣與新竹市等以結核菌素測定為陽性之山羊而送本所病性鑑定者。

### 二、待測血清：

係 1987 年採自花蓮縣之山羊血清 265 頭與 1982 年採自全省結核菌素反應陽性之牛血清 105 頭，均保存於 -30℃ 者。

### 三、病理檢查：

送檢之山羊均施以病理解剖，觀察肉眼病變，並採集全身臟器，以 10% 中性福馬林固定，包埋、切片後，分別以蘇木紫及伊紅染色 (H & E stain) 或直接以抗酸性染色 (acidfast stain) 在光學顯微鏡下觀察其組織病理變化。

### 四、微生物分離與鑑定：

對肉眼有乾酪樣壞死灶或化膿灶之病材直接以馬血液培養基培養後，放置在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 孵卵器中培養 48 小時，分離 *C. pseudotuberculosis*，又抗酸菌染色陽性之病材以病變部用蒸餾水製成 10 倍乳劑後以 1,000 rpm 離心 5 分鐘，採取上清液，再以 3,000 rpm 離心 40 分鐘，去除上清液後加入 1% NaOH 約 1 ml 攪拌後放置 15 分鐘，取 0.1 ml 接種於 Lowenstein Medium (Difco) 在 37°C 培養，觀察 2 個月，檢視 *Mycobacterium* 菌之發育。所分離之 *C. pseudotuberculosis* 均依 Washington<sup>(15)</sup> 方法鑑定之，又抗酸菌之鑑定依小林及極東製藥 (日本) 株式會社製品之抗酸菌同定盒進行鑑定菌種。

#### 五 抗生素感受性試驗：

以所分離之 5 株 *C. pseudotuberculosis* 依 Kirby-Bauer<sup>(10)</sup> 法進行抗生素感受性試驗。

#### 六 人工感染試驗：

經分離鑑定之 *C. pseudotuberculosis* 860523 株，在 Brain Heart Infusion broth 增菌後，分別以  $1 \times 10^6$  / ml 之菌液 1.0 ml 靜脈與肌肉人工感染山羊各 1 頭，感染前後每間隔 2 週採血，並觀察病程至死亡，死亡後分別解剖做病理檢查與細菌分離。

#### 七 凝膠沉澱法 (agar gel precipitin, AGP) 抗原之製備與實施：

*C. pseudotuberculosis* 外毒素 AGP 抗原之製備與實施係改良自 Burrell<sup>(6)</sup> 之方法，簡述如下：

1. *C. pseudotuberculosis* 之培養液為在 Brain Heart Infusion 中添加 0.5% glucose 與 0.1% Tween 80，並添加 0.0025% 之 Phenol red 做為酸鹼指示劑，並以 NaOH 將酸鹼值調至 pH 7.5。
2. 接種 *C. pseudotuberculosis* 後之培養液，在 37°C 攪拌培養 15 小時 (過夜) 此時 pH 值會下降，以 NaOH 將酸鹼值重新調回 pH 7.5，每隔 2 小時觀察，pH 下降 (不可低於 pH 5.5) 即調整至

7.5，至 pH 不再下降時，則添加 0.5% glucose，此時 pH 值又會下降，如此重複添加 NaOH 與 glucose 至 pH 不再下降為止。

3. 收集 *C. pseudotuberculosis* 培養液，以 8,000 rpm 離心 30 分鐘後，取上清液通過 0.22  $\mu$  濾過膜，並以 70% 飽和濃度之硫酸銨濃縮 25 倍，透析後再以 90% 冷丙酮液沉澱濃縮 2 倍，即為 AGP 抗原，並以 *C. pseudotuberculosis* 標準陽性血清測定抗原之力價。本法製備之 AGP 抗原係為 *C. pseudotuberculosis* 之外毒素，以此測定被感染動物之抗毒素。
4. AGP 瓊脂為含 0.5% Bacto agar (Difco) 之生理食鹽水，待加熱完全溶解後，當溫度下降至 50°C 時添加 merthiolate 至 0.01% 並將之分裝於直徑 9 cm 之 Petri dish，每盤 12 ml (高約 2 mm)，待瓊脂凝固後，以打孔器將瓊脂切出 5 mm 之孔徑，如圖 1，以此進行 Out-chlony 雙向免疫擴散法，並置於 37°C 感作 48 小時後判定。

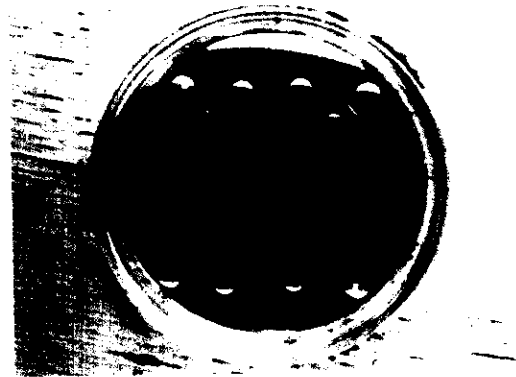


圖 1 *C. pseudotuberculosis* 其外毒素之抗體測定。圖左之沉降線係陽性牛血清，圖右之沉降線係陽性山羊之血清。

## 結 果

### 一 病例調查與細菌分離：

從 1986 至 1987 年間，山羊結核菌素反應

陽性送本所檢驗者共 8 個病例，其解剖病變，細菌分離與血清診斷之比較如表 1。在 8 個病例中共分離到 *C. pseudotuberculosis* 5 株，分別為：860523, 860527, 86-H-03, 87-H-04, 87-H-07 等株，此外分離到 *Mycobacterium bovis* 2 株，在 5 個 *C. pseudotuberculosis* 病例中，分離到菌株之臟器出現頻率分別為：

耳下淋巴 2 例，顎下淋巴 2 例，其他支氣管淋巴，縱膈淋巴，咽背淋巴各 1 例。

而 *Mycobacterium sp.* 之 2 例，均從腸系膜淋巴分離而得。在 *C. pseudotuberculosis* 感染之其中 2 例，亦以血清學之 AGP 法證明有 *C. pseudotuberculosis* 感染。

二病理檢查：

解剖之病羊，不論是 CLA 亦或是結核病均呈現淋巴節之乾酪樣壞死或化膿灶，在內臟系統性感染者，則肺臟與肝臟等亦常出現病變，但在解剖之 8 例中發現 CLA 多在頭部，頸部與呼吸道之淋巴造成病變（如圖 2），如耳下淋巴、顎下淋巴、咽背淋巴、支氣管淋巴與縱膈淋巴。而結核病者則在腸系膜淋巴造成病變。在組織病理方面不論是 CLA 亦或是結核病均造成典型之乾酪樣壞死或化膿灶之病變，但 CLA 在組織病理中看不到 giant cell（如圖 3、4），此是兩者唯一的區分。

三細菌鑑定及生化性狀：

在所分離到 5 株之 *C. pseudotuberculosis*

表 1. 1986 至 1987 年結核菌素反應陽性山羊病例之診斷比較

病 例	解 剖 病 變 (caseous necrosis or abcess)	<i>C. pseu- dotuber- culosis</i> 之 分 離	<i>Mycobac- terium</i> 之 分 離	分 離 臟 器	<i>C. pseudotuber- culosis</i> AGP test
花 蓮 縣	腸系膜淋巴	—	+	腸系膜淋巴	NT*
860523	耳下淋巴與 支氣管淋巴	+	—	耳下淋巴與 支氣管淋巴	+
860527	耳下淋巴與 腸系膜淋巴	+	NT	耳下淋巴	NT
86-H-03	顎下淋巴 縱膈淋巴 腸系膜淋巴 肺與乳房	+	—	顎下淋巴與 縱膈淋巴	+
87-H-04	顎下淋巴	+	—	顎下淋巴	NT
87-H-07	咽背淋巴 支氣管淋巴 與肺	+	—	咽背淋巴	NT
87-H-10	腸系膜淋巴	—	acid-fast 染色陽性	腸系膜淋巴	NT
87-H-11	腸系膜淋巴 肺與肝	—	+	腸系膜淋巴	NT

\* NT：未測試

sis 均係從淋巴節之病灶中以血液培養基分離而得，且其理化性狀亦均呈一致，在 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，以血液培養基培養 48 小時即可見淡黃色不透明之菌落（如圖 5），菌落的特性為含脂肪量高，顯得較為乾燥，同時不易釣菌，常於釣菌時造成菌落的碎裂或滑動，菌體於燃燒時則發出炸裂聲，本菌為具溶血性之 Gram “+” 多形性桿菌，生化反應中陽性者有 catalase, urease, glucose 與 maltose (O/F)，而生化反應陰性者有：motility, nitrate reduction, gelatin hydrolysis, arginine decarboxylase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, 醣類 O/F 陰性者有 sucrose, xylose, lactose, galactose, arabinose, raffinose, mannitol, inositol, sorbitol, adonitol 與 salicin。

#### 四、分離菌之藥劑感受性試驗：

對所分離之 5 株 *C. pseudotuberculosis* 以 Kirby-Bauer 法進行抗生素感受性試驗，5 株之結果亦呈一致，屬 susceptible 之抗生素有：Ampicillin (10 μg)，Bacitracin (10 μ)，Chloramphenicol (30 μg)，Doxycycline (30 μg)，Erythromycin (15 μg)，Lincomycin (2 μg)，Tetracycline (5 μg)，Sulfamethoxazol-Trimethoprim (23.75 μg, 1.25 μg)。屬 intermediate 之抗生素有：Gentamycin (10 μg)。而屬 resistant 之抗生素有：Kanamycin (30 μg)，Polymyxin B (300 μ) 與 Streptomycin (10 μg)。

#### 五、人工接種試驗：

以靜脈注射與肌肉注射分別將 10<sup>8</sup> 菌/ml 之 *C. pseudotuberculosis* 人工感染山羊各一頭，其結果如（表 2），兩組山羊在人工感染前均為 AGP 抗體陰性，而感染後 2 週即轉為陽性，靜脈注射之山羊在感染後 35 天死亡，而肌肉注射之山羊則在感染後 180 天死亡，解剖之病變均為各臟器之多發性壞死與化膿灶，並分別從縱膈淋巴與頸下淋巴回收細菌。

#### 六、抗體調查：



圖 2 病例 86-H-03 (*C. pseudotuberculosis* 分離陽性) 在頸下淋巴所造成之化膿灶病變。

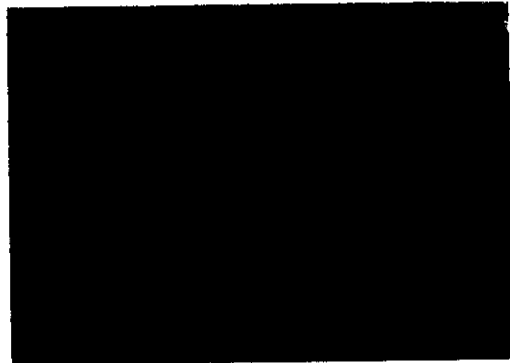


圖 3 病例 87-H-11 (*Mycobacterium bovis* 分離陽性) 在腸系膜淋巴所造成之組織病變，其中可見明顯之 giant cell (H&E stain, × 100)。



圖 4 病例 86-H-03 (*C. pseudotuberculosis* 分離陽性) 在頸下淋巴所造成之組織病變，其中均未見到 giant cell (H&E stain, × 100)。



圖5 *C. pseudotuberculosis* 在血液培養基上呈現不透明淡黃色之菌落，常於鈎菌時造成菌落之碎裂與滑動(↑)。

以標準 *C. pseudotuberculosis* 陽性血清測定本試驗製備之 AGP 抗原力價，結果顯示抗原有 4 倍力價，以此抗原測定 1987 年山羊血清 265 頭與 1982 年結核菌素反應陽性牛血清 105 頭，結果發現有 30 頭山羊 (11.3%) 為 *C. pseudotuberculosis* 抗體陽性，而在結核菌素反應陽性牛亦有 10 頭 (9.5%) 為 *C. pseudotuberculosis* AGP 抗體陽性 (如表 3)。

### 討 論

由於乾酪樣淋巴腺炎在山羊與綿羊的病程多是慢性不顯性感染，故可靠的流行病學統計數據並不多，Williams 等<sup>(10)</sup>報告在澳洲屠宰場統計有 58% 的綿羊被感染，Campbell 等<sup>(6)</sup>報告本病在美國廣泛的流行，當山羊達 4 歲齡時，則 22% 的山羊有化膿灶病變，Maddy<sup>(11)</sup>報告在美國西部因本病而被宣告肉品不合格之山羊，佔排名第 3 位，趙等<sup>(1)</sup>在 1985 年 10 月至 1986 年 7 月調查日本北海道 248 頭綿羊屠體中有 13 頭 (5.2%) 之淋巴節，肝及肺等看見乾酪樣壞死及化膿灶並分離細菌，而本試驗以 AGP 法調查本省山羊 265 頭，發現陽性之山羊 30 頭，陽性率為 11.3%，此都說明本病污染的嚴重。

在所分離之 5 株 *C. pseudotuberculosis* 其生化性狀與抗藥性試驗結果均呈一致，並與

Muckle 等<sup>(12)</sup>所鑑定之 25 株 *C. pseudotuberculosis* 性狀相符合，在人工感染試驗以  $10^8$  菌/ml 靜脈或肌肉接種山羊，仍須 35 ~ 180 天方能致死，此亦說明本病致病之慢性與造成不顯性的感染。

由於 *C. pseudotuberculosis* 菌體含脂肪量過高，不利於血清學之診斷，故本病之血清學診斷多利用本菌所產生之外毒素<sup>(4,5,7,9,12,17)</sup>，本試驗所製備之 AGP 抗原亦為外毒素，在檢測被感染動物之抗毒素。本次試驗製備之 AGP 抗原與原法<sup>(5)</sup>略有不同，由於 *C. pseudotuberculosis* 菌體含脂肪量相當高，故在攪拌培養時常常長成菌塊，經改在培養液添加 0.1% 之 Tween 80 後，可使本菌在液態培養基中均勻的懸浮生長，使菌體與外毒素的產量大增，但由於 Tween 80 可造成血清之非特異性反應，在硫酸銨濃縮透析後，仍不能將之去除，故使用 acetone 沉澱法的主要目的乃是將 Tween 80 去除，同時亦可達濃縮的目的。

由於早經證實 *C. pseudotuberculosis* 會引起結核菌素在山羊與綿羊之非特異性反應<sup>(14)</sup>同時 *C. pseudotuberculosis* 在山羊、綿羊的污染又較 *Mycobacterium* 為嚴重，故本次在 8 個臨床結核菌素反應陽性之山羊中，竟分離到 *C. pseudotuberculosis* 5 株，遠超過 *Mycobacterium* 之分離數，而 *C. pseudotuberculosis* 在牛的疫情則不甚明了，僅有過數件病例報告<sup>(2,3,8)</sup>，回顧過去，本省因結核菌素反應陽性而撲殺之牛隻，常有病理與微生物均檢查不出 *Mycobacterium* 之情形，在本次調查 1982 年結核菌素反應陽性牛血清之 *C. pseudotuberculosis* 抗毒素後，竟發現有 9.5% 的陽性率，故推測過去因結核菌素反應陽性而撲殺的牛隻，有相當的部份可能是 *C. pseudotuberculosis* 感染而造成的非特異性反應。

對於將來牛與羊之結核病診斷，除了結核菌素試驗外，亦應做 *C. pseudotuberculosis* 的血清學檢查，對本病之血清學診斷趙等<sup>(1)</sup>報告以特異性及敏感性而言，免疫溶血反應 (Immune hemolysis, IHL) 及酵素結合

表 2. 山羊 *C. pseudotuberculosis* 之人工感染試驗

組 別	接 種 劑 量	死 亡 時 間	解 剖 病 變	細 菌 回 收 臟 器	AGP test	
					感 染 前	感 染 後 2 週
靜脈注射	10 <sup>8</sup> 菌/ml	35 天	各臟器多發性之 壞死與化膿灶	縱膈淋巴	-	+
肌肉注射	10 <sup>8</sup> 菌/ml	180 天	各臟器多發性之 壞死與化膿灶	顎下淋巴	-	+

表 3. 以 AGP 法調查本省山羊與結核菌素反應陽性牛血清中 *C. pseudotuberculosis* 之抗毒素

動 物	採 樣 年 代	調 查 頭 數	AGP 陽 性 數 ( % )
山 羊	1987	265	30 ( 11.3 )
結 核 菌 素 反 應 陽 性 牛	1982	105	10 ( 9.5 )

免疫吸附法 (ELISA) 優於間接紅血球凝集反應及凝膠沉澱法，將來可應用 ELISA 或 IHL 等方法診斷本病，同時牛與羊之或是結核病亦或是 CLA，解剖時在病理上之病變常不易區分，因此抗酸菌染色就顯得更為重要，在微生物分離亦應 *Mycobacterium* 與 *Corynebacterium* 兩者並重，方能做最正確的診斷。

### 誌 謝

本試驗中組織病理承本所生物系病理研究室，楊喜吟、李淑慧、張聰洲同仁協助完成，又承花蓮縣、台北縣、桃園縣、新竹縣與新竹市家畜疾病防治所提供病材，並承中興大學楊孟慧小姐之幫助血清測定，特此誌謝。

### 參 考 文 獻

1. 趙宏坤、久枝啓一、平棟孝志、菊池直

哉、小笠原徹、橫山敦志、廣川和郎。1987。ヒツジの *Corynebacterium pseudotuberculosis* 感染症の浸潤狀況調査と本病の血清診斷。日獸會誌 40 : 281 ~ 285。

- Barakat, A.A., S.A. selim, A. Atef, M.S. Saber, E.K. Nafie, and A.A. El-Ebeedy, 1984. Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 3:151-163.
- Biberstein, E.L., H.D. Knight, and S.Jang, 1971. Two biotypes of *Corynebacterium pse-*

- udotuberculosis. *Veterinary Record* 89:691-692.
4. Burrell, D.H. 1980. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Research in Veterinary Science* 28:190-194.
  5. Burrell, D.H. 1980. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. *Research in Veterinary Science* 28:234-237.
  6. Campbell, S.G., M.K. Ashfaq, and J.J. Tashjian, 1982. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. *Proceedings 3rd International Conference on Goat Production and Disease*. Tucson, Arizona pp.449-454.
  7. Doty, R.B., H.W. Dunne, I.F. Hokanson, and J.J. Reid, 1964. A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. *American Journal of Veterinary Research* 25:1679-1685.
  8. Kariuki, D.P. and J. Poulton. 1982. *Corynebacterial* infection of cattle in Kenya. *Tropical Animal Health and Production* 14:33-36.
  9. Knight, H.D. 1978. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Cornell Veterinarian* 68:220-237.
  10. Lennette, E.G., A. Balows, W.J. Hausler, and J.P. Truant, 1980. *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd ed. Washington D.C., American Society for Microbiology.
  11. Maddy, K.T. 1953. Caseous lymphadenitis in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 122:257-259.
  12. Maki, L.R., S.H. Shen, R.C. Bergstrom, and L.D. Stetzenbach, 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in sheep, using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research* 46:212-214.
  13. Muckle, C.A. and C.L. Gyles 1982. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46:206-208.
  14. Shukla, R., N. Nath, and G. Singh, 1971. Observations on non-specific reactions to tuberculin in sheep and goats with *Corynebacterium ovis*. *Experientia* 27:204-205.
  15. Washington, J.A. 1981. *Laboratory procedure in clinical microbiology*. Springer-Verlag New York Inc.
  16. Williams, C.S.F. 1980. Differential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goat. *Veterinary Record* 107:11-12.

- terinary Medicine and Small Animal Clinician 75:1165-1169.
17. Zaki, M.M. 1968. The application of a new technique for diagnosing Corynebacterium ovis infection. Research in Veterinary Science 9:489-493



## Epidemiological Investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Taiwan

Y.S. Lu, M.J. Kwang, Y.K. Liao, D.F. Lin, Y.L. Lee  
and C. Lee

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

A total of 8 tissue samples from the goat showing positive tuberculin tests were investigated from 1986 to 1987. Five strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*) and 2 strains of *Mycobacterium bovis* have been isolated in this study.

A total of 265 serum samples collected from goat during 1987 and 105 sample sera collected from cattle exhibiting positive tuberculin tests during 1982 were detected by agar gel precipitation test using an antigen prepared from *C. pseudotuberculosis* exotoxin. The results indicated that 30 goat serum samples and 10 serum samples from these cattle revealed the positive reactions that suggested they were previously infected by *C. pseudotuberculosis*.

The patterns of drug susceptibility were found to be similar for all 5 local isolates of *C. pseudotuberculosis* on the basis of Kirby-Bauer's standard procedures. They were susceptible to ampicillin (10  $\mu$ g), bacitracin (10  $\mu$ g), chloramphenicol (30  $\mu$ g), doxycycline (30  $\mu$ g), erythromycin (15  $\mu$ g), lincomycin (2  $\mu$ g), tetracycline (5  $\mu$ g) and sulfamethoxazol-trimethoprim (23.75  $\mu$ g, 1.25  $\mu$ g), respectively.