

臺灣牛隻病毒性呼吸道疾病研究

1 牛隻微量血清中和抗體調查研究

鍾明華 邱朝齊 林榮培

(臺灣省家畜衛生試驗所)

P. Hummel

(西德柏林自由大學)

陳永雄

(國立臺灣大學獸醫系)

摘 要

利用最簡單的微量血清中和技術 (Micro-Serum-Neutralization test)，同時完成牛隻四種重要呼吸道疾病病毒，亦即牛傳染性鼻氣管炎 (IBR)，牛腺病毒七型 (Adenovirus Type 7)，副流行性感冒三型 (PI-3) 及病毒性下痢 (BVD) 等病毒全省性、大規模的抗體調查，調查率約佔全省乳牛口之 5%。中和抗體價在 1：4 或以上者分別為 28.5%、94.8%、84.3% 及 38.4%。以縣市言，高雄市牛隻 IBR、Adenovirus-7 及 PI-3 抗體價在 1：4 或以上者分別為 92.8%、100% 及 100%，幾乎所有牛隻均被污染，高居全省之冠。花蓮縣牛隻 Adenovirus-7 及 PI-3 抗體亦均為 100%，但却無 IBR 及 BVD 抗體存在。由此調查顯示本省牛隻受 Adenovirus 及 PI-3 病毒之侵染已極為嚴重，而 BVD 則較預期者輕。

緒 言

爲了改善國民的體質與健康，近年來本省乳業在政府的輔導及獎勵之下，始有今日之基礎。本省牛隻除了在光復初年遭受一次牛瘟侵襲外，幾無其他嚴重的傳染病發生，然類似下痢、流行性感冒等病症却時有所聞，爲了證實病毒性疾病之存在，林敬覆等 (17) 曾完成 IBR, Adenovirus Type 1 及 PI-3 等病毒之抗體調查，然而後兩種病毒之抗體測定以 HI 方法行之，血清之處理至爲繁雜，且 HI 之敏感性尚有所爭論，同時本省南部及東部牛隻未在測定之例。劉培柏等 (18) 亦曾以試管血清中和方法完成 BVD 之抗體調查，但在實驗中以胎牛血清 (Fetal calf serum) 配製細胞維持液。根據 Baker et al (1)、Hubbert et al (3)、Kentrick (6) 及 Rossi et al (13) 等證實某些牛胎兒血清中含有 BVD 抗體，而筆者亦從一批牛胎兒血清測得 BVD 抗體，因之若採用未經測定之血清配製維持液，對實驗成績恐有所影響。有鑑於此，乃以簡化過、最節省人力與材料之微量血清中和技術，重新以乳牛爲對象，實施一較大規模之調查工作。若非採用此種技術，欲在有限人力之下行大規模之調查工作則甚無可能矣！

材料與方法

供試血清：由各縣市防治所於 1977 年 9—10 月間採取之乳牛血清，以 56°C、30 分鐘非動化後，保存於 -20°C 冰箱備用。

試驗細胞：牛胎兒肺臟細胞 (BEL) 及牛睪丸細胞 (BT) 第 2—10 代培養細胞。AuBEK 株化細胞分讓自美國阿拉巴馬州歐本大學 (Auburn Uni.)。

供試病毒：IBR-Cooper 株及 BVD-NADL 株等病毒乃分讓自歐本大學。Adenovirus Type 7—Fukuroi 株及 PI—3—R2—V 株等病毒為 Dr. Hummel 自西德携來者。

微量血清中和試驗：中和試驗依 Rosenbaum et al (9), Sullivan et al (15) 及 Rosei et al (11) 等方法，再稍加簡化而實施之。Eagle's MEM 培養液，加入 8% 經測定不含 IBR, Adenovirus Type 7 及 PI—3 等病毒抗體之牛胎兒血清 (GIBCO 產品)，200 U. penicillin/ml, 200 mcg Streptomycin/ml 及 2.5 mcg Fungizone/ml，並以 7.5% NaHCO₃ 調整 pH 後，做為血清稀釋液、病毒稀釋液及細胞培養液。另以無球蛋白牛胎兒血清 (GG-Free Fetal Calf Serum) 取代牛胎兒血清做為 BVD 抗體測定用。受試血清先以試管內行 2 倍稀釋，再以 0.025ml Micropipette 移滴於滴定盤內 (Microplates)，加一滴 100 TCID₅₀ 之病毒混合之，置於 37°C 感作 60—90 分鐘，然後加一滴含有 300,000/ml 細胞混懸液，稍加震盪使細胞均勻分佈，最後膠帶封貼後，移置於 37°C 繼續培養。另外作抗原之反滴定 (Backtitration)，以確定使用病毒量。IBR 抗體測定於 4 日後判定，其他三種則於 7 日後判定 (11, 12)。

滴定盤之再使用：將使用過之滴定盤內培養液倒棄，把滴定盤浸泡於 1:200 Clorex 水溶液中一夜，翌晨以自來水分沖洗，再以蒸餾水浸泡一夜，翌晨取出涼乾後置於無菌箱內，以 UV 照射滅菌一夜。

結 果

一、牛傳染性鼻氣管炎 (IBR) 中和抗體測定成績 (表 1) 顯示本省牛隻抗體在 1:4 或以上者佔 28.2%，其中以高雄市為最高，達 92.8%；而臺北縣有 8 頭抗體價超過或等於 1:256，此在 IBR 感染中甚為少見；基隆市與花蓮縣牛隻則未被感染。

二、牛腺病毒七型 (Adenovirus Type 7) 抗體調查結果 (表 2)，顯示本省牛隻抗體在 1:4 或以上者佔 94.8%；高雄市、宜蘭縣、花蓮縣、臺中縣、苗栗縣、基隆市及屏東縣所有牛隻皆被污染，無一倖免。

三、牛副流行性感冒 (PI—3) 抗體調查結果 (表 3)，牛隻抗體在 1:4 或以上者佔 84.3%。高雄、花蓮縣、基隆市牛隻全被感染。

四、本省牛隻 BVD 中和抗體調查結果 (表 4)，抗體價在 1:4 或以上者，雲林縣為最高 (81.7%) 苗栗縣次之 (57.1%)，但未能從花蓮縣牛隻血清中測得抗體。

表 1. 臺灣乳牛 IBR 中和抗體價分佈

縣 市 別	中 和 抗 體 價 及 其 頭 數									測 定 頭 數	陽 性 率 (%)
	< 4	4	80	16	32	64	128	≥ 256			
基 隆 市	12	0	9	0	0	0	0	0	0	12	0
臺 北 縣	96	3	5	2	1	4	2	8		121	20.7
桃 園 縣	47	2	2	0	3	3	2	1		60	21.7

新	竹	縣	45	0	5	2	4	4	1	0	61	26.2
苗	栗	縣	11	1	0	0	0	1	0	1	14	21.4
臺	中	縣	37	4	5	6	7	5	2	0	66	43.9
雲	林	縣	59	7	11	11	13	9	0	1	111	46.9
嘉	義	縣	60	3	5	4	2	2	1	0	77	22.1
臺	南	縣	47	1	1	5	4	2	3	3	66	28.8
臺	南	市	74	1	0	0	4	1	0	0	80	7.5
高	雄	縣	38	1	4	3	5	1	0	0	52	26.9
高	雄	市	5	4	14	12	23	6	4	1	69	92.8
屏	東	縣	117	3	5	2	9	4	9	1	150	22.0
宜	蘭	縣	9	0	0	0	0	1	0	0	10	10.0
花	蓮	縣	14	0	0	0	0	0	0	0	14	0
臺	東	縣	18	5	5	4	8	4	2	0	46	60.9
合	計		689	35	62	51	83	47	26	16	1009	28.2

表 2. 臺灣乳牛 Adenovirus—7 中和抗體價分佈

縣	市	別	中和抗體價及其頭數							測定頭數	陽性率 (%)	
			< 4	4	8	18	32	64	128			≥ 256
基	隆	市	0	0	4	4	0	2	1	0	11	100
臺	北	縣	19	10	19	31	12	6	5	19	121	84.3
桃	園	縣	2	2	9	10	10	11	6	4	54	96.3
新	竹	縣	11	2	8	7	10	8	9	11	66	83.3
苗	栗	縣	0	0	0	2	2	4	4	2	14	100
臺	中	縣	0	1	7	8	13	24	11	2	66	100
雲	林	縣	14	6	15	16	17	25	10	7	110	87.3
嘉	義	縣	6	0	3	6	22	13	18	3	71	91.6
臺	南	縣	5	5	16	15	11	4	4	0	60	91.7
臺	南	市	4	0	4	3	12	17	22	18	80	95.0
高	雄	縣	4	6	3	9	6	12	9	3	52	92.3
高	雄	市	0	1	7	10	19	15	11	4	67	100
屏	東	縣	1	2	9	14	23	23	46	19	137	99.3
宜	蘭	縣	0	1	2	2	4	0	1	0	10	100
花	蓮	縣	0	1	2	6	2	11	0	2	14	100
臺	東	縣	2	0	8	5	11	4	5	1	46	95.7
合	計		68	37	116	148	174	179	162	95	980	94.8

表 3. 臺灣乳牛 P1-3 中和抗體價分佈

縣 市 別	中 和 抗 體 價 及 其 頭 數									測 定 頭 數	陽 性 率 (%)
	< 4	4	8	16	32	64	128	≥ 256			
基 隆 市	0	0	2	1	1	3	2	0	9	100	
臺 北 縣	24	3	7	18	24	26	13	6	121	80.2	
桃 園 縣	1	0	5	12	13	14	7	1	53	98.1	
新 竹 縣	2	0	10	11	10	17	9	7	66	96.7	
苗 栗 縣	9	0	1	0	3	0	1	0	14	35.7	
臺 中 縣	7	2	3	9	13	18	11	3	66	89.4	
雲 林 縣	26	5	3	3	9	18	26	20	110	76.4	
嘉 義 縣	6	0	2	6	15	18	13	17	77	92.2	
臺 南 縣	11	3	5	12	14	17	10	0	72	84.7	
臺 南 市	7	3	9	16	21	14	6	3	79	91.1	
高 雄 縣	12	0	3	3	7	14	7	6	52	76.9	
高 雄 市	0	0	2	4	4	20	23	16	69	100	
屏 東 縣	33	4	15	23	33	21	16	3	148	77.7	
宜 蘭 縣	4	0	0	1	3	1	1	0	10	60	
花 蘭 縣	0	1	1	2	3	7	0	0	14	100	
臺 東 縣	5	0	4	4	6	14	10	3	46	89.1	
合 計	147	25	72	125	179	222	155	85	1010	84.3	

表 4. 臺灣乳牛 BVD 中和抗體價分佈表

縣 市 別	中 和 抗 體 價 及 其 頭 數									測 定 頭 數	陽 性 率 (%)
	< 4	4	8	16	32	64	128	≥ 256			
基 隆 市	6	0	0	0	0	0	1	4	11	41.7	
臺 北 縣	99	0	0	0	3	4	1	14	121	18.2	
桃 園 縣	27	0	0	0	2	7	1	12	49	44.9	
新 竹 縣	46	0	4	1	0	1	3	11	66	30.3	
苗 栗 縣	6	0	0	0	0	0	2	6	14	57.1	
臺 中 縣	27	2	2	0	0	5	2	8	46	41.3	
雲 林 縣	19	3	1	0	6	4	21	50	104	81.7	
嘉 義 縣	47	0	0	0	1	3	8	18	77	39.0	
臺 南 縣	31	1	1	2	0	7	9	3	54	42.6	
臺 南 市	56	0	1	4	6	6	2	5	80	30.0	

高 雄 縣	32	0	0	2	4	6	2	6	52	38.5
高 雄 市	39	0	0	0	0	0	3	16	58	32.8
屏 東 縣	90	0	0	2	1	1	21	27	142	36.6
宜 蘭 縣	8	0	0	0	1	0	0	1	10	20.0
花 蓮 縣	14	0	0	0	0	0	0	0	14	0
臺 東 縣	17		0	0	3	5	3	18	46	60.0
合 計	56	6	9	11	27	50	79	199	945	38.4

討 論

IBR, Adenovirus 及 PI-3 等病毒皆廣泛分布於全世界各國家 (5, 7, 8, 10, 16), 由本試驗得知本省牛隻亦多有抗體存在, 尤其是高雄市牛隻受感染尤重。此三種病毒與呼吸道疾病均息息相關, 是否因受高雄市污濁的空氣所影響?

IBR 抗體比1974年林敬覆所得的結果多出約四倍⁽¹⁶⁾, 可見此病毒已漸蔓延。BVD亦是個分佈甚廣的病毒, Jensen (4), Gillespie (2) 等稱美國大部分牛隻均有抗體。但此次調查結果却發現本省牛隻 BVD 抗體出乎意料的少, 但抗體價却偏高, 與 1975 年劉培柏等所得結果有所出入, 推測可能導因於不同的採取對象及地區, 其所使用之牛胎兒血清可能含 BVD 抗體亦未可知。

IBR, PI-3 及 BVD 病毒中和抗體終點 (End point) 甚為明顯, 易於判讀, 但 Adenovirus Type 7 却不甚明顯, 往往拖延幾個稀釋階, 判讀時偶感困擾。又滴定盤使用多次一經 UV 光照射滅菌多次之後, 品質漸差, 對細胞稍具毒性。

一般而言, Herpes's virus, 如 IBR, 很少有 Non-specific reaction (14), 所以 1:4 之抗體力價可視作陽性。不具有蛋白衣之病毒在中和試驗中亦很少有非特異性抑制作用。具有蛋白衣之病毒, 如 PI-3, 在 HI 試驗中, 血清內之非特異性抑制因子在低稀釋階時比較容易構成問題。本試驗中, 以牛胎兒血清做對照結果, 未發現此現象。

誌 謝

本試驗蒙農復會之經費補助, 謹於此誌萬分謝忱。並向黃士則先生於試驗工作之協助致謝。

參 考 文 獻

1. Baker, J. A., York, C., Gillespie, J. H. and Mitchell, G. B. 1954. : Virus Diarrhea in Cattle. AmJVR, 15 : 525—531.
2. Gillespie, J. H. 1968. : Comments on Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease. JAVMA, 152 : 768—769.
3. Hubbert, W. T., Bryner, S. H., Fernelius A. L., Frank, G. H. and Estes, P. C. 1973. | Viral Infection of The Bovine Fetus and Its Enviroment. Arch. Gesamte. Virusforsch, 41 : 86—98.
4. Jensen, R. and Mackey R. R. 1971. : Bovine Viral Diarrhea (Mucosal Disease) in "Diseases of Feedlot Cattle" 47—56.
5. Kahrs, R. F. 1977. : Infectious Bovine Rhinotracheitis : A Review and Update.

- JAVMA, 171 : 1055—1064.
6. Kendrick, J. W. 1971. : Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Virus Infection in Pregnant Cows. *AmJVR*, 32 : 533—544.
 7. Mohanty, S. B. 1971. : Comparative Study of Bovine Adenovirus. *AmJVR*, 33 : 1889—1905.
 8. Reisinger, R. C. and Heddleston K. L. 1959. : A Myxovirus (SF—4) Associated with Shipping Fever of Cattle. *JAVMA*, 135 : 147—152.
 9. Rosenbaum, M. L., Phillips, I. A., Sullivan, E. J., Edwards, E. A. and Miller, L. F. 1963. : A Simplified Method for Virus Tissue Culture Procedures in Microtitration Plates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113 : 224—229.
 10. Rosner, S. F. 1971. : Bovine Parainfluenza Type 3 Virus Infection and Pasteurellosis. *JAVMA*, 159 : 1375—1382.
 11. Rossi, C. R. and Kiesel, G. K. 1971. : Microtiter Tests for Detecting Antibody in Bovine Serum to PI—3 Virus, IBR Virus, and BVD Virus. *Appl. Microbiol.*, 22 : 32—36.
 12. Rossi, C. R., Kiesel, G. K. and Emrick, V. R. 1973. : Distribution of Antibody to Bovine Adenovirus Type 1 in Alabama Cattle, as Determined by Micro-Serum-Neutralization Test. *AmJVR*, 34 : 841—842.
 13. Rossi, C. R. and Kiesel, G. K. 1974. : Antibody to Viruses Affecting Cattle in Commercial Tissue Culture Grade Fetal Calf Serum. *Appl. Microbiol.*, 27 : 114—117.
 14. Rossi, C. R. : Personal communication
 15. Sullivan, E. J. and Rosenbaum, M. J. 1967. : Methods for Preparing Tissue Culture in Disposable Microplates and Their Use in Virology. *Amer. J. Epidemiol.*, 85 : 424—437.
 16. Woods, G. T. 1968. : The Natural History of Bovine Myxovirus Parainfluenza—3. *JAVMA*, 152 : 771—776.
 17. 林敬覆、邱朝齊、呂榮修、鍾明華、林榮福、詹益波、黎南榮、鄭建盛、王雅娟、陳守仕。1976 : 臺灣乳肉牛病毒性疾病 IBR, PI—3 Adeno—1 之抗體調查。畜衛研報, No. 11 : 57—62.
 18. 劉培柏、黃天祥、馬清猷、吳義興、張文發。1975 : 本省牛隻 BVD 抗體調查, 畜衛研報, No. 12 : 35—40.

Studies on Bovine Viral Respiratory Diseases in Taiwan

I. Distribution of Antibody to Several Viruses in Dairy Cows,
as Determined by Micro-Serum-Neutralization Tests.

M. H. Jong, T. C. Chiu, and Y. P. Lin,
(Taiwan provincial Research Institute for Animal Health)

P. Hummel
(Free University, Berlin)

Y. H. Chen
(Veterinary Medicine Department, National Taiwan University)

Summary

A large and whole island scale serological investigation to IBR, Adenovirus Type 7, PI-3 and BVD viruses for cows had been accomplished by using Micro-Serum-Neutralization test. Approximately 5% of cows were examined. SN titer of 1:4 or higher to IBR, Adenovirus-7, PI-3, and BVD viruses were 28.2%, 94.8%, 84.3%, and 38.4% respectively.

Tremendous high percentage of anti-IBR (92.8), anti-PI-3 (100) and anti-Adenovirus-7 (100) antibody were detected in the cows raised in Kaoshiung City. High percentages of antibody to Adenovirus-7 (100) and PI-3 (100) were also found in the cows of Hualien Prefecture but non to IBR and BVD in this area. Serological investigation indicated most of the cows in the island have been infected by Adenovirus and PI-3 virus but the contamination of BVD virus was not so serious as expectation.