

# 臺灣牛布氏病之研究

血清學調查、病原分離和鑑定及對天竺鼠之病原性

陳守仕<sup>1</sup> 蘇杰夫<sup>1</sup> 陳素貞<sup>1</sup> 鄭建盛<sup>1</sup> 蔡義雄<sup>2</sup>

張瑞森<sup>2</sup> 吳福明<sup>3</sup> 劉正義<sup>4</sup>

自 1976 年至 1978 年，由臺灣各縣市家畜疾病防治所以平板急速凝集反應測定疑似布氏病 (Brucellosis) 牛隻共 8,219 頭，經以補體結合反應與試管凝集反應複檢判定呈陽性反應共 185 頭。陽性牛隻中 109 頭採取乳汁行布氏桿菌之分離；其分離率以直接分離法為 68.8% (75/109)，經試驗動物分離法為 76.1% (83/109)。又陽性撲殺牛隻中採集 45 頭之臟器行本病原菌之分離；其直接分離法為 53.7% (29/54)，經試驗動物分離法為 72.2% (39/54)。所有分離株經生化性狀、對色素之耐性、血清凝集反應及天竺鼠之感受性試驗，鑑定為 *Brucella abortus*。

大部分天竺鼠經分離株接種後於血液—淋巴器官顯現程度不等的網狀內皮細胞增殖現象；部分則可於生殖系統見多發局限性壞死灶；明顯的中性球及淋巴球浸潤以及輕微的類上皮細胞增殖。接種動物其病原主要集中於血液—淋巴，生殖器官及肝次之，而肺及心臟最少。

布氏病係人畜共同傳染病。政府為保障國人健康並促進乳牛業之發展，乃訂定乳牛布氏病之檢驗政策，每年由各縣市家畜疾病防治所對轄內乳牛執行二次之檢驗工作，撲殺陽性反應牛，並期能達成消滅本病之目標。由於各牧場及酪農戶對本病之重要性已有相當認識，加以政府能以較合理價格補償陽性牛被撲殺的經濟損失，因此乳牛布氏病之檢驗政策遂能順利推行，且有相當之績效<sup>(1,4,9)</sup>。然而，近年來由國外大批進口乳、肉牛之後，感染本病之牛隻又有增加之趨勢，乃普遍引起對本病之關心及重視。

本省一向缺乏牛布氏病之研究；詹等<sup>(6)</sup> (1964 年)，呂等<sup>(2)</sup> (1964 年) 林等<sup>(5)</sup> (1965 年) 曾有自乳牛分離出本菌之報告。但迄今十數年來，未曾有人再進行本病之探討。因此為瞭解本病最近在本省之發生狀況，以為加強及改進檢驗工作，筆者等咸認有進行本病之流行病學、分離菌之病原性狀及其病原性等研究之必要，乃於 1976 年至 1978 年間進行本試驗。

## 材 料 與 方 法

### 一、試驗材料及步驟：

自 1976 年迄 1978 年間各縣市家畜疾病防治所以平板急速凝集反應測定為疑似布氏病陽性牛隻共 8,219 頭為試驗材料，每一頭疑陽性牛採血清，並冷藏送省家畜衛生試驗所行血清學反應之複檢試驗。經血清學反應試驗呈陽性之牛隻，則由各縣市防治所執行撲殺工作，並從中蒐集乳汁及臟器，

民國 68 年 3 月 10 日受理

1. 臺灣省家畜衛生試驗所

2. 農林廳

3. 農復會畜牧生產組

4. 省立屏東農專獸醫科

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 15: 1— (1978)

( 2 )

包括：坐骨、腸骨、膝髌、顎下及乳房等淋巴節，以及生殖器官子宮及（或）胎兒為材料行病原菌之分離及鑑定試驗。分離菌株並行天竺鼠之人工感染試驗，以研討其病原性。

## 二、血清學反應試驗：

### 1. 試管凝集反應試驗<sup>(8,10,14,18)</sup>：

受檢血清以 0.5 % 石炭酸食鹽水由 10 倍開始稀釋至 160 倍，然後加入等量之適當單位凝集抗原（購自日本農林省家畜衛生試驗場），經充分混合，置於 37°C 經 20~24 小時之感作後判定。於 80 倍呈 25% 凝集度時為陽性，20 倍以下呈 25% 凝集度者為陰性反應。

### 2. 補體結合反應試驗：

受檢血清以 0.01% 硫酸鎂食鹽水由 5 倍開始稀釋，然後加入適當單位之抗原（購自日本農林省家畜衛生試驗場）及補體（Difco）後，置於 4°C 經 16~18 小時之低溫感作，再加入感作血球液使充分混合，並置於 37°C 經 30 分鐘感作後判定。若 5 倍以上呈 50% 之阻止溶血反應者為陽性；呈溶血反應者為陰性反應。

## 三、病原之分離：

依 Nicoletti & Muraschi (1966) 之方法<sup>(19)</sup>，將乳汁經 3,500 rpm 30 分遠心，取沉澱物及脂肪層行直接分離及經試驗動物接種分離，內臟病材則製成 10 倍乳劑後依同樣方法分底。

使用之培地係仿照 LTB 法<sup>(12)</sup>，於 Tryptic Soy Agar (Difco) 中加入 5~10% 牛血清 (GIBCO) 及 Bacitracin (Sigma)、6000IU/ml Polymyxin B (Sigma)、1:8,000,000 Ethyl Violet 等抑菌劑，經接種的培養皿置於 37°C，於 5~10% CO<sub>2</sub> 之條件下培養。經試驗動物接種分離者，每週採血測定凝集素出現情形，俟凝集素產生時試殺，再行相同方法的病原分離。

## 四、生化性狀試驗<sup>(2,5,6,10)</sup>：

1. CO<sub>2</sub> 要求性試驗：將分離接種於含有 10% 牛血清之 Tryptic Soy Agar 後，以 CO<sub>2</sub> 好氧性等不同條件比較培養，測定細菌對 CO<sub>2</sub> 培養的要求性。

2. H<sub>2</sub>S 產生能試驗：係將含有醋酸鉛之濾紙，置於待測菌接種之培養上，經 4 日的 CO<sub>2</sub> 培養，以觀察 H<sub>2</sub>S 產生情形，若變黑色即有 H<sub>2</sub>S 產生。

3. 尿素分離能試驗：於含有 4% Urease 之磷酸緩衝液（含第二磷酸鈉 4.8g、硫酸鉀 1.8g、0.4% 酵母抽出液 2 ml、水 98 ml、0.2% Phenol red 1 ml）0.5 ml 中加入等量之菌液後，置於 37°C，觀察有否變色（桃色）。

4. Catalase 產生試驗：將菌液 0.5ml 與等量之 3.5% 過氧化氫液混合，觀察其產生氣泡程度。

5. 色素感受性試驗：將 Thionin (Grüber) 分別以 1:10,000，1:30,000 及 1:50,000 加入含 10% 牛血清之培養基，另將 Basic Fuchsin (Merck) 亦分別以 1:10,000，1:25,000 及 1:50,000 加入 10% 牛血清培養基上。將待測菌株分別接種於含有不同濃度之 Thionin 與 Basic Fuchsin 培養基上，經 37° 3~4 天之 CO<sub>2</sub> 培養，次觀察其對色素之耐性。

## 五、分離株對許驗動物之病原試驗<sup>(8,12)</sup>：

將分離株經上述方法鑑定後，以 1 ml 菌液 (10<sup>9</sup>/ml) 腹腔接種於 250~300g 之天竺鼠，然後逐週採血，測定凝集素之產生情形，俟凝集素出現時試殺，採取心、肝、肺、腎、脾、生殖器官等臟器及顎下、腋窩、鼠蹊、腸間及肺門等淋巴節行病理學檢查及病原菌之分離，並測定該菌體在試驗動

物體內之分佈情形。

#### 六、組織病理學檢查：

行腹腔接種之人工感染天竺鼠，採集呈現肉眼病變之淋巴節、脾、肝、生殖器等臟器固定於 10% 中性福馬林液，行石臘包埋及切片，切片行哈里氏蘇木紫——伊紅染色後鏡檢。

### 試 驗 結 果

從 1976 年至 1978 年，由臺灣省各縣市防治所以平板急速凝集反應法測定疑似感染布氏病之乳牛共 8,219 頭，經由試管凝集反應及補體結合反應等方法複檢後，判定陽性牛僅 185 頭。大部分陽性牛散布在南部，其中以屏東縣為最嚴重；其三年之陽性頭數高達 155 頭，占全部陽性頭數之 83.8% (155/185)，且集中於某一私人牧場。其詳情如表一所示。

表一、臺灣牛布氏病血清學反應成績 (1976~1978)

縣 市 別	受 檢 頭 數				陽 性 頭 數			
	65 年	66 年	67 年	合 計	65 年	66 年	67 年	合 計
臺 北 縣	166	425	163	754	—	—	—	—
桃 園 縣	27	26	46	99	—	—	—	—
新 竹 縣	39	144	24	207	3	1	—	4
苗 栗 縣	18	70	21	109	3	—	—	3
臺 中 縣	229	246	102	577	1	—	—	1
南 投 縣	30	20	32	82	—	—	—	—
彰 化 縣	284	95	66	445	1	—	—	1
雲 林 縣	218	280	105	603	1	—	—	1
嘉 義 縣	264	249	133	646	4	—	—	4
臺 南 縣	435	431	364	1230	6	2	1	9
高 雄 縣	28	100	72	200	3	2	1	6
屏 東 縣	700	1027	577	2304	54	62	39	155
宜 蘭 縣	0	10	6	16	—	—	—	—
花 蓮 縣	71	39	38	148	—	—	—	—
臺 東 縣	18	122	51	191	—	—	1	1
臺 中 市	264	2	7	273	—	—	—	—
臺 南 市	27	63	23	113	—	—	—	—
高 雄 市	28	52	80	160	—	—	—	—
臺 北 市	12	18	32	62	—	—	—	—
合 計	2858	3419	1942	8219	76	67	42	185

註：1. 受檢頭數係經平板急速凝集反應呈陽性牛隻。

2. 陽性頭數係經試管凝集反應及補體結合反應試驗後判定為陽性牛隻。

( 4 )

由血清學反應陽性牛隻取乳汁及臟器行病原分離，並分別以直接分離及經試驗動物分離法進行比較；結果顯示經試驗動物分離法較直接分離法之分離率為高。109 例乳汁，以直接法分離出 75 例，而經試驗動物法却分離出 83 例；又 54 例臟器以直接法只可分離出 29 例，而經試驗動物法則可分離到39例（見表二）。

表二、布氏病血清學反應陽性牛之病原分離成績

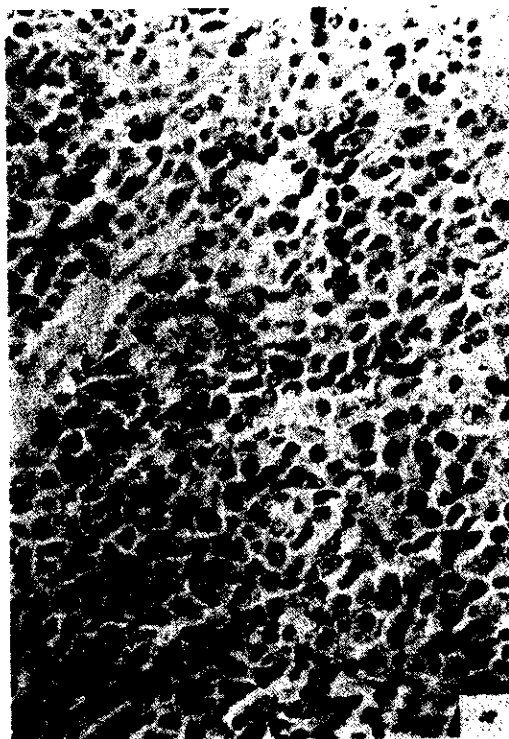
縣 市 別	血清學陽性 頭 數	分 離 方 式			
		直 接 分 離		試 驗 動 物 分 離 法	
		乳 汁	臟 器	乳 汁	臟 器
新 竹 縣	4	2/3	0/3	2/3	1/3
苗 栗 縣	3	2/3	1/3	3/3	1/3
臺 中 縣	1	—	0/1	—	1/1
彰 化 縣	1	—	0/1	—	0/1
雲 林 縣	1	—	0/1	—	1/1
嘉 義 縣	4	1/4	—	2/4	—
臺 南 縣	9	1/2	1/6	1/2	3/6
高 雄 縣	6	—	0/2	—	1/2
屏 東 縣	155	68/96	27/37	74/96	31/37
臺 東 縣	1	1/1	—	1/1	—
合 計	185	75/109	29/54	83/109	39/54

註：分母：受分離頭數。 分子：病原被分離出之頭數。

選擇分離菌 12 株，人工感染天竺鼠，每株接種 4 頭共接種 48 頭。所有接種動物均可自體內不同臟器及組織分離到接種菌株。檢討其病原體於體內之分佈情形，顯示以淋巴系統及脾臟之分離率最高，且菌落數目大都皆在 20 個以上；次為肝及生殖器官，菌落數目在 10~20 個之間，再次為腎及肺，菌落數在 10 個以下；至於心血則偶可見菌落而已（係將 1 公克分離材料製成 10 倍乳劑，0.5ml 培養至 *Brucella* 培養基所得之結果）。接種動物之主要肉眼變化為淋巴節腫大、脾臟腫大，睪丸與子宮則偶可見明顯之多發局限性壞死灶。鏡下以子宮之壞死及肉芽腫為最具特徵。壞死灶散佈於子宮內膜及肌層，壞死灶中堆聚許多細胞碎片及中性球，其周圍則圍繞以許多類上皮細胞、淋巴球及中性球，亦可見明顯的血管炎及血栓形成。（圖 1,2,3）。淋巴系統包括脾的病變則以網狀內皮細胞之增

### 圖 片 說 明

- 圖 1 天竺鼠，子宮。 *Br. abortus* 接種後 28 日。子宮內膜呈明顯的早期肉芽腫性炎症反應及中性球浸潤。右下角為壞死灶，其邊緣圍繞以中性球為主的炎症反應帶 H&E 染色×40。
- 圖 2 同上。子宮腔聚集炎症滲出物（左）。子宮內膜新生肉芽組織，富含血管，並見少數中性球浸潤。 H&E 染色×200。
- 圖 3 同上。子宮肌層之組織間隙見顯著的淋巴球浸潤現象。H&E 染色。100倍。
- 圖 4 天竺鼠。脾。*Br. abortus* 接種後 28 日，明顯之網絲細胞增殖並充斥於脾紅髓。H&E 染色×400。



殖為顯著(圖4)但甚少見壞死灶。

所有之分離株經生化性狀試驗結果,皆需在 CO<sub>2</sub> 條件下方能發育,可產生 H<sub>2</sub>S,對尿素可分解,並有 Catalase 之產生能,對 Thionin 皆有感受性,但對 Basic Fuchsin 却有抵抗力;並可與標準之 *Brucella abortus* 抗血清呈凝集反應。即所有分離株皆屬 *Br. abortus*。但其屬何種血清型,尚待受檢中。

## 討 論

據呂等<sup>(2)</sup>於1964年之報導,布氏病乃以北部及中北部地區之出現率為高,但此次之流行病學調查,本病反而以南部為嚴重。僅屏東縣其三年之陽性頭數即有155頭,佔全部陽性頭數的83.8%(155/185)。經調查得知,這些污染區域之牧場部份剛由國外輸入牛種。到底是輸入牛隻傳染本地牛,還是本地牛隻傳染了進口牛,則難以確定。無論如何,由國外輸入之動物應加強檢疫工作,方是保護國內養牛事業的條件。又臺東縣原為本病清淨地區,但於1978年却有陽性牛隻出現,據調查該陽性牛隻乃購自屏東縣轄之某污染牧場,此乃嚴防患畜移動之法規未徹底執行之結果。

目前本所對本病之血清學診斷,乃使用試管凝集反應及補體結合反應。而今許多先進國家已使用 Micro-CF test,比較上此法所應用之抗原及受檢血清之使用量極微,又可用儀器自動操作,節省時間及人力,故實有待開發應用。又各縣市防治所目前使用的平板急速凝集法對本病之初步檢驗,顯示其準確率甚差。從初步疑似陽性的8,219例中,僅185例於複檢中被證實為陽性牛,致使酪農們對檢驗成績失去信心。吳<sup>(3)</sup>(1978)曾應用玫瑰苯(Rose bengle)抗原進行本病之檢驗試驗,其成績較接近試管凝集法及補體結合反應法。並且該法之判定較清晰而簡單,實有必要發展以供縣市防治所應用。

本試驗在陽性牛之病原菌分離方面,其病材以乳汁較臟器之分離率高,經動物分離法比直接分離法之分離率高,此印證了詹<sup>(4)</sup>(1964)之試驗。其於22頭血清學陽性反應牛隻中,僅8頭可由臟器中分離出布氏桿菌,但却可由乳汁中分離出12例。又據柴田<sup>(11)</sup>(1976)報告,對120頭乳牛行本病病原分離結果,以乳汁、乳房及坐骨淋巴節之分離率最高。但其分離率依血清學反應出現凝集素之時間長短而不同,若凝集素開始出現後二個月以內行細菌分離者,以坐骨、乳房、鼠蹊淋巴節之分離率為最高;若凝集素出現後超過二個月以上者,則乳汁、乳房淋巴節之分離率較高。目前本省每半年對本病檢驗一次,筆者認為陽性牛隻之凝集素出現情形,當屬二個月以上,故在分離上自以乳汁之分離率較臟器為高。

病原菌在試驗動物體內內佈情形,血液—淋巴器官為最高,生殖器次之,偶而可由心、肺分離出本菌,此亦與詹等<sup>(6)</sup>(1964)之試驗成績相似,但筆者等之試驗,與詹等之試驗比較則生殖器病原分佈較高。對本菌之分離,可先藉人工感染於天竺鼠,再由其淋巴系統及肝臟分離本菌,可得很好效果。

天竺鼠人工感染布氏桿菌的病理變化,依感染時間之不同,其病變有異。通常感染時間愈久則組織之乾酪化壞死及肉芽腫病變愈顯著。本次試驗由於天竺鼠接種後出現凝集素就試殺,以探討病原分佈,故感染時間顯然不足於出現本病標準之慢性肉芽腫病變。然而從淋巴組織之出現網狀內皮細胞增殖,少數病例可在子宮等生殖器官見壞死灶及早期的肉芽腫病變,亦可明瞭接種菌株之病原性。

此次所有分離菌株被鑑定為 *Br. abortus* Type 1-9 之不同血清型,其血清型間之諸性狀稍異,此次筆者等分離株藉生化性狀等之鑑定,似較傾向為 I 型菌,但為確切起見仍繼續鑑定中。

*Br. abortus* 亦可感染其他動物早經證實 Marthur (1967) 曾以 *Br. abortus* 抗原檢驗山羊之凝集素,並於 856 例陽性反應羊隻之乳汁中分離出 *Br. abortus* 10 例; Allsup<sup>(13)</sup> (1969) 也曾由

4 例患有流產症之綿羊分離出本菌 Clegg & Rorrison<sup>(15)</sup> (1968) 曾由患多發性關節炎之狗由關節內分離出 *Br. abortus*. McCullough 等<sup>(17)</sup> (1949) 曾由豬體分離出菌，雖未能再度使豬隻感染致病，但可能因此而成爲不顯性感染之傳染源，而感染其他動物及牛隻。在臺灣，劉等<sup>(7)</sup> (1955) 曾以本菌人工感染黃牛、豬及山牛。黃牛與山羊之感染情形相似，而豬的感受性較鈍。因此本省對於本病之防疫，似仍應防範上述動物之媒介。

## 誌 謝

本項試驗蒙農復會之加速農村建設計畫之補助，全省各縣市防治所協助送材，臺大獸醫學系德籍教授 Dr. Hummel 技術協助，使本項試驗得以進行，謹申謝忱。

## 參 考 文 獻

1. 王銘堪，1961。牛傳染性流產菌症檢驗成績總檢討（第一報）。臺灣省畜牧獸醫工作報告，(1)：6—11。
2. 呂榮修、邱泰山、林仁志、劉燃炎，1964。臺灣家畜布氏桿菌病之現況。臺灣家畜衛生試驗所報告，2：43—52。
3. 吳義興，1978。牛布氏桿菌玫瑰苯抗原之研製。臺灣家畜衛生試驗所第153次學術研討會摘要。
4. 林本欽，1962。臺灣布氏桿菌病之疫學的考察。臺灣省畜牧獸醫工作報告，4(4)：1—9。
5. 林本欽，1965。由乳牛分離之布氏桿菌型別試驗。臺灣畜牧獸醫學會報，8：34—37。
6. 詹益波、邱泰山、林仁志、徐長壽、劉燃炎，1964。布氏桿菌病乳牛之菌分離試驗。臺灣家畜衛生試驗所研究報告，2：31—31。
7. 劉燃炎、呂榮修、謝竹茂，1955。臺灣產家畜對於牛流產菌人工感染反應試驗。臺灣省畜牧獸醫學會研究報告，49—53。
8. 傅祖慧、蔡文敏，1963。牛氏布桿菌病之診斷試驗。臺灣省畜牧獸醫工作報告，5(2)：5—45。
9. 蘇振杰，1962。乳牛布氏桿菌病防治工作檢討會。臺灣省畜牧獸醫工作報告，4(4)：37—38。
10. 伊佐山康郎，1971。日本に於ける牛ブルセラ病の血清診斷。日本農林家畜衛生試驗場研究報告，62：64—82。
11. 柴田重孝，1970。ブルセラ病，最新家畜傳染病。日本江堂。
12. 渡邊守松、山野輝夫、大地隆溫、乾純夫，1960。モルモットの *Brucella abortus* 感染試驗。I. 感染初期における菌の分佈，肝のグラヌローマ形成と血清反應との關係について。日本家畜衛生試驗場試驗報告，38：75—88。
13. ALLSUP T. N., 1969. Abortion in sheep associated with *Brucella abortus* infection. *Vet. Rec.* 84 : 104-108.
14. ALTON, G. G, LOIS M. JONES and D. E. PIETZ. 1975. Laboratory techniques in Brucellosis. FAO and WHO. 2th ed. Switzerland : 11-124.
15. CLEGG, F. G, and RORRISON, J. M. 1968. *Brucella abortus* infection in dog : A case of polyarthritis. *Res Vet. Sci.* 9 : 183-185.
16. MARTHUR, T. N. 1967. Isolation of *Brucella abortus* from goats and sheep in the punjab. *Indian J. Vet Sci.* 37 : 277-286.
17. MCCULLUGH, N. B. EISELE, C. A. and POVELEEK, E. 1949. Isolation of *Br. abortus* from hogs. *Pnb. Health Rep* : 64 : 537.

( 8 )

18. MORGAN W. J. 1967. The serological Diagnosis of Bovine Brucellosis. Vet. Rec. 80 (21) ..621-620.
19. NICOLETTI, P. and T. F. MURASCHI , Bac-teriologic Evaluaton of serologic test Pro-cedures for the Diagnosis of Brucellosis in Problem cattle Herds. Am. J. Vet. Res. 27 (118) , 689-694.



## Studies on Bovine Brucellosis in Taiwan

Serological Surveys, Isolation and Identification of Pathogens, and  
Pathogenicity to Guinea Pigs

S. S. CHEN<sup>1</sup>, J. F. SU<sup>1</sup>, S. C. CHEN<sup>1</sup>, J. S. JENG<sup>1</sup>, I. S. CHAI<sup>2</sup>,

S. S. CHANG<sup>2</sup>, F. M. WU<sup>3</sup> and C. I. LIU<sup>4</sup>

Of 8, 219 serum samples collected from Brucellosis-suspected dairy cows which were positive in rapid or plate agglutination test during 1976 to 1978. in Taiwan. One hundred and eighty-five cases were confirmed by both tube agglutination and complement-fixation tests for Brucellosis-Positive. Of which, milk samples (109 Brucellosis-positive cows) and several visceral organs (54 eradicated Brucellosis-positive cows) were taken for the isolation purpose. The milk samples were shown 68.8% isolation rates (75/109) in direct method, and 76.1% (83/109) in animal inoculation and enrichment method. The visceral organs were shown 53.7% isolation rates (29/54) in direct method, and 72.2% (39/54) in animal inoculation and enrichment method. All the isolates were identified as *Brucella abortus* by biological tests, dye tolerance, serum agglutination tests and susceptibility In histopathological exam to guinea pigs.

The inoculated guinea pigs showed Various level of proliferation of reticuloendothelial cells in lymphoid organs in most cases. Multifocal necrosis associated with marked infiltration of neutrophils and lymphocytes, and mild proliferation of epitheloid cells were noticed in some cases. In those inoculated guinea pigs, the pathogens concentrated highly in the hemo-lymphatic organs and lowly in the lung and the heart.

- 
1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
  2. Department of Agriculture & Forestry of Taiwan Provincial Government.
  3. The Joint Commission on Rural Reconstruction.
  4. Taiwan Provincial Pingtung Institute of Agriculture.