

臺灣牛群感染赤羽病及中山病病毒之疫學研究

廖永剛* 呂榮修 黃士則 張秋燕

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 在本省發生牛非化膿性腦膜腦炎病例的嘉義縣進行牛全血中的病毒分離，結果在懷疑有非化膿性腦炎與異常產病例中的 18 戶中，共收集 112 例的紅血球液分別進行病毒分離，有 4 株赤羽病病毒，及 4 株中山病病毒分離得。顯示這地區的牛非化膿性腦膜腦炎病因，赤羽病及中山病病毒是疾病發生的主要病原。以本省分離的赤羽病病毒和中山病病毒進行本省在養牛群的中和抗體力價檢測，結果發現本省牛群已普遍存有抗體，抗體陽性率分別為 96% 和 91%，顯示病毒的傳播也非常普遍。因而對這兩種病毒的疫情須加強防範。而同時收集苗栗縣及新竹縣進口牛血清，也測試牛赤羽病與中山病的抗體，結果在苗栗縣進口牛血清 153 頭中有 17 頭是赤羽病抗體陽性（陽性率為 11%），在新竹縣是 58 頭牛血清中有 2 頭是赤羽病抗體陽性（陽性率為 3%）。而中山病抗體，結果全部是抗體陰性。為加強本省的防疫，除開發本土性的疫苗外，更須注意鄰近國家的疫情，以免許多疾病病原透過糠蠓或其它媒介傳播到本省，造成產業傷害。

關鍵詞：赤羽病，中山病，節肢動物媒介病毒

緒言

赤羽病是由 Bunyaviridae 的 Bunyavirus 屬中 Simbu 群所屬的赤病病毒 (Akabane virus) 感染所引起的流死產及先天性的關節彎曲症與水腦症症候群 (Arthrogryposis-Hydraencephaly Syndrome: AH 症候群) (7,8,9,17,20)，主要對牛、綿羊及山羊引起生產異常仔牛的疾病。赤羽病病毒最早係於 1959 年在日本群馬縣館林市郊外的赤羽村牛舍內採集的 *Culex tritaneniorhynchus* 及 *Aedes vexans* 所分離的新病毒，故命名為赤羽病病毒(5,13,16)。之後在澳洲及日本的糠蠓 (Culicoides) 也能分離到本病毒(3,18,10)，所以確定赤羽病病毒可以透過吸血昆蟲傳播，因而將赤羽病病毒規類為節肢動物媒介病毒 (Arthropod-born virus; Arbovirus)。本病在 1972~1975 年時在日本關東以西大流行，造成 42,000 個病例報告，並且由自然感染的牛隻胎兒和監測用的牛隻血液分離出赤羽病病毒(8)。顯示牛群中有大量的病毒分佈。在澳洲的報告也發現赤羽病病毒可在監測站的牛隻及羊隻血液中被分離出來(19,2)，同時在非洲也報告赤羽病

病毒可分別在蚊子及糠蠓中分離到(5)。對於本病所造的傷害目前除日本之外，在澳大利亞、以色列及土耳其等國家亦有發生的報告。

臺灣由於地處亞熱帶，氣候高溫且潮濕，是適合蚊子及糠蠓滋生的環境，所以曾經在牛舍內以紫外線誘引燈採集糠蠓，發現牛舍內糠蠓主要是 *Culicoides oxystoma* 及 *C. nipponesis* 這兩種，並且受氣候環境溫度的影響會有季節性的消長(1)。而由赤羽病病毒的研究發現，在牛舍內的 *Culicoides oxystoma* 是為傳播赤羽病病毒的一種媒介(10)。筆者曾於 1990 年調查本省部份牛隻節肢動物媒介病毒的抗體，發現牛隻普遍存有赤羽病的抗體(12)，但對於赤羽病病毒的分離則尚未有報告。

牛中山病是首先由日本學者在日本九州的鹿兒島市中山町首先分離而命名(4,14)。是由 Reoviridae 中的 Orbivirus 感染所引起母牛流產與出生小牛呈水腦或小腦缺損的畸型，或是出生後小牛無法站立與盲目的疾病。本省於 1991 及 1992 年分別在田間牛非化膿性腦膜腦炎和小牛無站立的病例中分離到中山病病毒，顯示本病毒在本省牛群中佔一重要地位。

*抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所

為對本省的疫情能確實掌握，及確保母牛能安全的生產，故收集本省各縣市在養牛之 83 年度布氏桿菌病陰性血清，進行牛赤羽病及中山病病毒的血清抗體檢測，以瞭解本省牛群中疾病的感染率 (prevalence)，而供防疫措施之參考

材料及方法

1. 病原分離及病毒分離用細胞：

由全省各縣市提供懷疑病例及疫情，採集病牛的加抗凝劑全血，血液先經 2,000 rpm 離心 5 分鐘，分離出血球液及血漿，經分別收集血漿後，血球液部份再經 PBS 清洗 3 次後，以 PBS 還原為原來全血容積，再置入 -80°C 冷凍保存供病毒分離用。同時若有發病牛經剖檢後也採集其臟器製成 10 倍乳劑，經低溫離心後取上清液保存，供病毒分離用。

病毒分離用細胞：主要使用 HmLu 及 BHK 繼代細胞，其它有牛睪丸初代細胞，MDBK、Vero 等細胞。細胞培養用培養液是以 Eagle's MEM，添加 8% 胎牛血清，並以 7.5% NaHCO_3 調整 PH 為 7.0~7.2。病毒分離用維持液使用含 2% Bovine Serum Albumin 及 10% Tryptic phosphate broth，及以 7.5% NaHCO_3 調整 PH 為 7.0~7.2。

2. 病毒分離與鑑定：

病材接種於細胞後，繼代 3 代以上培養觀察有無 CPE 形成，如有 CPE 形成者，將培養的上清液進行冷凍離心後，取離心後的上清液進行電子顯微鏡檢查，在負染色後以穿透式電子顯微鏡 (HITACH CO. H600 型) 檢查有無病毒顆粒。

3. 血清收集與中和試驗：

收集全省各縣市在在養牛布氏桿菌病檢查陰性血清，經分裝保存後取部份血清非動化供抗體檢測用。中和試驗進行的方式，係先取 0.05 ml 血清和等量稀釋液進行 2 倍序列連續稀釋，然後再加入等量的含 200 TCID 病毒液在 37°C 感作 60 分鐘，再各加入 0.1 ml HmLu 細胞液，細胞濃度為 3×10^4 ，培養液為含 5% 胎牛血清的培養液。以能阻止 CPE 形成之最高血清稀釋倍數為抗體力價，抗體力價在 2 倍或以上者判定為陽性。

結果

病毒分離的結果在嘉義縣境內懷疑有非化膿性腦炎與異常產病例中之牛場共 18 戶，採血進行病毒分離，結果在 112 例的紅血球液中，有 4 株 Bunyavirus (圖 1)，及株 Orbivirus (圖 2) 分離得。經進行病毒-血清的交叉中和試驗，而證實分離的 Bunyavirus 為赤羽病病毒的 Iriki 株 (表 1)。

而以本省分離的赤羽病病毒 (PT-17 株) 進行本省在養牛群的中和抗體力價檢測，其結果如表 2。證實本省牛群已普遍存有抗體，陽性率為 96%，並且在陽性牛隻中有 97% 是在抗體力價 4 倍以上，而且抗體在 8 至 64 倍之間的牛隻有 81%，表示赤羽病病毒在牛群的分佈極普遍。以本省分離的中山病病毒 (91-H16 株) 進行本省在養牛群的中和抗體力價檢測，其結果如表 3，抗體陽性率是 91%。所顯示的結果也證實本省牛群是普遍受中山病病毒感染。

同時收集苗栗縣及新竹縣進口的在養牛血清，測試牛赤羽病與中山病的抗體，結果在苗栗縣進口牛血清 153 頭中有 17 頭是赤羽病抗體陽性 (陽性率為 11%)，而新竹縣進口牛血清 58 頭中有 2 頭是赤羽病抗體陽性 (陽性率為 3%)。另外對這些進口牛血清測試牛中山病抗體，結果全部是抗體陰性。顯示進口牛在進口前並未受該類病毒的感染。

表 1 本省分離毒株和日本赤羽病病毒 Iriki 株交叉中和試驗的結果

病 毒 株	免 疫 血 清	
	本省分離株 (PT-17)	赤羽病病毒 (Iriki 株)
本省分離株 (PT-17)	1,024*	512
赤羽病病毒 (Iriki 株)	1,024	1,024

* 抗體力價顯示為可中和病毒的最高血清稀釋倍數

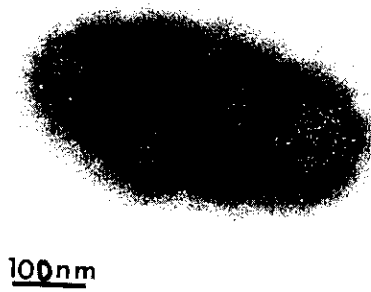


圖 1 本省分離的赤羽病病毒 (bar = 100 nm)

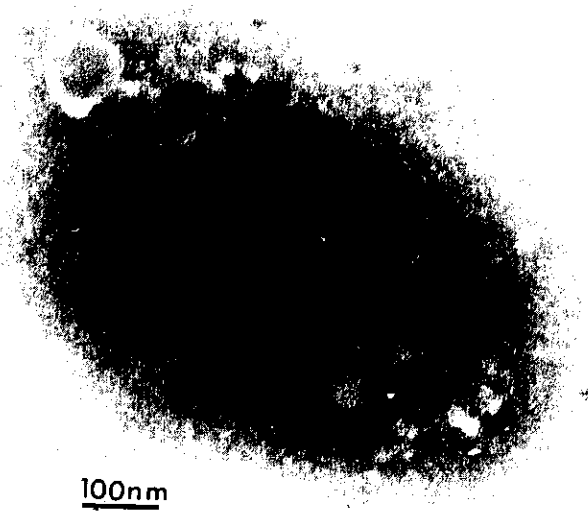


圖 2 本省分離的中山病病毒 (bar = 100 nm)

表 2 本省分離赤羽病病毒 (PT-17 株) 進行本省在養牛群的中和抗體力價檢測結果

力 價	台 北 縣	苗 栗 縣	新 竹 縣	台 中 縣	彰 化 縣	嘉 義 市	臺 南 縣	高 雄 縣	屏 東 縣	台 東 縣	合 計
受檢數	190	200	100	200	168	60	200	200	200	134	1,652
< 1	9	3	6	1	4	14	16	0	0	6	59
1	6	10	0	5	1	1	3	0	6	5	37
2	15	35	3	24	20	4	10	9	25	17	162
3	30	44	10	39	43	7	25	35	41	38	312
4	31	48	20	47	40	7	50	40	47	40	370
5	32	37	30	49	38	17	46	54	48	20	371
6	43	14	17	28	17	8	41	41	19	5	233
7	19	7	7	8	5	2	9	16	10	1	81
> 8	5	2	7	2	0	0	0	5	4	2	27
平 均	4.4	3.7	4.7	4.0	3.9	3.4	4.2	4.7	4.7	4.1	
陽性率	95 %	98 %	94 %	99 %	97 %	77 %	92 %	100 %	100 %	100 %	96 %

(註：抗體力價表示是以 2 為底的 Log 值)

表 3 本省分離中山病病毒 (91-H-16 株) 進行本省在養牛群的中和抗體力價檢測結果

力 價	台 北 縣	苗 栗 縣	新 竹 縣	台 中 縣	彰 化 縣	嘉 義 市	臺 南 縣	高 雄 縣	屏 東 縣	台 東 縣	合 計
受檢數	190	200	120	200	167	67	200	200	200	135	1,679
< 1	1	0	3	1	21	3	60	0	12	51	152
1	2	0	2	0	1	0	2	2	0	2	11
2	0	0	0	0	5	0	8	5	3	4	25
3	1	1	1	4	8	4	9	6	4	6	44
4	2	7	8	17	6	12	35	22	18	7	134
5	13	42	15	45	18	15	29	52	44	24	297
6	16	45	14	58	30	16	31	55	49	23	337
7	24	69	23	47	44	10	19	46	43	10	335
> 8	131	36	54	28	34	7	7	12	27	8	344
平 均	7.3	6.4	6.6	6.0	5.8	5.3	3.5	5.6	5.6	3.3	
陽性率	99 %	100 %	97 %	99 %	87 %	95 %	70 %	100 %	94 %	62 %	91 %

(註：抗體力價表示是以 2 為底的 Log 值)

討論

由於本省幼齡牛隻經常發生非化膿性腦膜腦炎的病例，而造成極大的經濟損失。本次在嘉義縣境內有非化膿性腦膜腦炎病例的牛場，進行病毒分離，而分別有赤羽病病毒及中山病病毒分離得，顯示這兩種病毒在野外是相當重要的感染病原。而於嘉義縣分離的赤羽病病毒是在一般健康的小牛血液中外離出，並經交叉中和試驗證實是和日本的赤羽病病毒 Iriki strain 是相同的 Strain。而這病毒據 Miyazato 等人⁽¹⁵⁾的分離報告顯示，該病毒對牛隻造成的傷害是引起牛隻的非化膿性腦膜腦炎。這和嘉義縣境內有牛隻發生非化膿性腦膜腦炎的病例疫情是有所相近，所以這病原性仍須進一步的試驗，以檢討分離病毒非化膿性腦膜腦炎病因有相關性。

至於中山病病毒也在這次的分離結果中有 4 株被分離得，所以對本省是否有母牛發生流產是因為中山病病毒感染所引起的仍須進一步的調查。而分離的病毒其病原性試驗仍須進一步的試驗。

而由牛群的中和抗體力價檢測，證實本省牛群已普遍存有抗赤羽病病毒和中山病病毒的抗體，陽性率分別為 96 % 和 91 %。而由前人對赤羽病及中山病病毒的研究發現這兩類病毒都是可以藉糠蠓進行傳播感染的^(5,10,14,19)。本省因位於高溫多溼的亞熱帶和熱代地區，糠蠓的出現是整年都有，所以在糠蠓是可以傳播赤羽病病毒和中山病病毒的情況下，造成這兩種病毒在牛群中流行是無法避免的。也因為有病毒的刺激，因而在本次對在養牛隻進行：抗體檢測的結困所出現的抗體陽性率都達 90 % 以上。所以本省目前並沒有暴發嚴重的牛隻流產病例，而是呈零星的在酪農戶中發生，因而在養的懷孕母牛可能在有部份抗體的保護下，即使受病毒感染的感染也呈不顯性感染，或是可中和病毒的毒力而保護胎兒。

但近年來有許多 4 至 8 月齡的仔牛常發生類似神經症狀的病例，這可能是因為牛隻的移行抗體降低，不足以抵抗野外的病毒感染而發病；或是其母牛為進口牛隻，而在進口後生產仔牛，在沒有移行抗體保護下受病毒感染而有發病的病例。所以為保護牛隻免受病毒的侵害，宜開發本土性的疫苗進行防疫。並對牛舍週圍環境保持清潔，減少病媒蚊的滋生以減少病毒傳播的機會。為能保護本省牛隻健康，及對進口牛做防疫措施，故須加強疫苗的研究開發，以供預防接種。為能完全監控節肢動物媒介病毒的疫情，希望本省能在南部某一清淨牛場，建

立監測牛群，供定期採血進行病毒分離與抗體調查之用。而對台灣之糠蠓是否會傳播牛肢動物媒介病毒的探討，也希望在牛場附近進行糠蠓的採集及進行病毒分離，期望在出沒於牛場的糠蠓體內能證實有肢動物媒介病毒的存在，這對本省牛肢動物媒介病毒的分佈與傳播能加以了解，而能在疾病尚未發生時先有預警作用。

參考文獻

1. 徐華山、洪信雄。1992。屏東地區乳牛場病媒蚊，蠓之季節消長，81 年度中華民國獸醫學會論文發表，台北市。
2. Della-Porta AJ O'Halloran ML, Parson IM, Snowdon WA, Murray MD, Hartly WJ and Haughey KJ, (1977) Akabane disease : Isolation of the virus from naturally infection ovine fetuses. *Aust. Vet. J.* 53 : 51 - 52.
3. Doherty RL, (1972) Arboviruses of Australia. *Aut. Vet. J.*, 48 : 172-180.
4. Goto Y, Miura Y and Kono Y (1988) Epidemiological survey of an epidemic of congenital abnormalities with hydronencephaly-cerebellar hypoplasia syndrome of calves occurring in 1985/86 and serological investigations on chuzan virus, a putative causal agent of the disease. (in Japanese) *Jpn. J. Vet. Sci.* 50(2) : 405 - 413.
5. Inaba Y and Matumoto (1990) Akabane virus. chapter 43, in *Virus infection of ruminants*, p.467 - 480.
6. Ito Y, Kurogi H, Goto Y, Inaba Y and Omori T (1979) Electron microscopy of Akabane virus. *Acta Virol.*, 23 : 198 - 202.
7. Kurogi H, Inaba Y, Goto Y, Miura Y, Takabashi H, Sato K, Omori T and Matumoto M (1975) Serologic evidence for etiologic role of Akabane virus epizootic abortion arthrogryposis hydranencephaly in cattle in Japan, 1972 - 1974. *Arch. Virol.*, 47 : 71 - 83.
8. Kurogi H, Inaba Takahashi E, Sato K, Omori T, Miura Y, Goto Y, Fujiwara Y, Hatano Y, Kodama K, Fukuyama Sasaki N and Matumoto M (1976) Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle : Isolation of

- Akabane virus from affected fetuses. *Arch. Virol.*, 51 : 67–74.
9. Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Satoda K, Goto Y, Omori T and Matumoto M (1977) Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect. Immun.*, 17 : 338–343.
 10. Kurogi H, Akiba Y, Inaba Y and Matumoto M (1987) Isolation of Akabane virus from the biting midge, *Culicoides oxystona* in Japan. *Vet. Microbiol.*, 15 : 243–248.
 11. Lien JC and Chen CS (1982) Seasonal succession of some common species of the genus *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in southern Taiwan. *J. of Formosan Med. Associ.* 81 : 514–523.
 12. Lu YS, Liao YK, Miura Y and Chiu SY (1990) The serological investigation of arbovirus in cattle in Taiwan. 5th AAAP proceeding 3 : 206.
 13. Matsuyama T, Oya A, Ogata T, Kobayashi I, Nakamura T, Takahashi M and Kitaoka M (1960) Isolation of arbovirus from mosquitoes collected at livestock pens in Gumma Prefecture in 1959. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 13 : 191–198.
 14. Miura Y, Goto Y, Kubo M and Kono Y (1988) Isolation of chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus *Orbivirus*, from cattle and *Culicoides oxystoma* in pathological study. *Research in Vet. Sci.*, 49 : 127–131.
 15. Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y and Kono Y (1989) Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate a new strain belonging to Akabane virus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51 : 128.
 16. Oya A, Okubo T, Ogata T, Kobayashi I and Matsuyama T (1961) Akabane, a new arbovirus isolated in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 14 : 101–108.
 17. Porterfield JS, Casals J, Chumakov MP, Gaidamovich SY, Hannoun C, Holmes IH, Horzinek MC, Mussgay M, Okar-Blom N and Russel PK (1976) *Bunyaviruses and Bunyaviridae*. *Intervirology*, 6 : 13–24.
 18. St George, TD, Cybinski, DH and Paul NI (1977) The isolation of Akabane virus from a normal bull. *Aust. Vet. J.*, 54 : 249.
 19. St. George, TD, Standfast, HA and Cybinski, DH (1978) Isolation of Akabane virus from sentinel cattle and *Culicoides brevitarsis*. *Aust. Vet. J.*, 54 : 558–561.
 20. Takahashi E, Inaba Y, Kurogi H, Sato K, Goto Y, Ito Y, Omori T and Matumoto M (1978) Physicochemical properties of Akabane virus, a member of the Simbu arbovirus group of the family *Bunyaviridae*. *Vet. Microbiol.*, 3 : 45–54.

The study on the epidemiology of Akabane virus and Chuzan virus infection in cattle in Taiwan.

*Liao, Y. K., Y. S. Lu, S. C. Hwang and C. E. Chang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.

SUMMARY Nonsuppurative encephalitis and congenital abnormalities cases have occurred in bovine herds in Chaiyi county in Taiwan. Four strains of Akabane virus and four strains of Chuzan virus were isolated from heparinized blood among 112 cattle which were fed in 18 dairy farms in Chaiyi county. From the results, we suspected that the Akabane virus and Chuzan virus might be the major pathogen causing nonsuppurative encephalitis cases in cattle. The serological survey was conducted on the antibody against Akabane disease and Chuzan disease in 1993. The antibody positive rate against Akabane disease in 1652 heads of cattle of Taiwan was 96 percent. The positive rate of Chuzan disease in 1679 heads of cattle was 91 %. According to this high morbidity, it is believed that cattle infected by Chuzan virus were very common. For the investigation of isolated virus in Taiwan, the sera of imported cattle which was feeding in Miaoli and Shinchung county were also detected antibody against Akabane disease and Chuzan disease. The result of Akabane disease was 17 heads to show positive reaction among 153 heads in Miaoli county (positive rate 11 %), and 2 heads to show positive reaction among 58 heads in Shinchung county (positive rate 3 %). Otherwise, no antibody against Chuzan disease was detected in these imported cattle. As the results, the imported cattle might free from Akabane virus and Chuzan virus infection before importation. As the conclusion, the isolated viruses may be an endemic pathogenic agent in Taiwan. The prevention policy should include developing vaccine with endemic virus strain to protect cattle in Taiwan.

Key words: *Akabane disease, Chuzan disease, Arbovirus.*

*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.