

25-3

牛傳染性鼻氣管炎之疫情調查與病毒分離

呂榮修 鄺懋勁 廖永剛 李永林
邱仕炎 林地發 李全

台灣省家畜衛生試驗所

1986年6月在本省高雄縣爆發了牛傳染性鼻氣管炎，隨即蔓延至鄰近之屏東縣、台南縣，然後慢慢消失，但在1987年又因進口牛放行後再引發牛傳染性鼻氣管炎之大流行。比較兩次之流行發現，1987年之流行造成大量成牛之死亡與流產，而1986年較為輕微，顯示1987年流行毒株對台灣牛之致病性較強。在兩次流行期間曾分離到牛傳染性鼻氣管炎病毒79株。

調查剖檢之組織內病毒分佈，發現以鼻腔潰瘍（ $\geq 10^6$ TCID₅₀/ml）、扁桃腺、胎盤、氣管粘液等力價較高，又比較發病牛鼻汁與眼分泌物之病毒分離率，則以鼻汁之分離率（64.3%）較高。

以凝膠沈澱法調查1986年高雄縣乳牛3261頭，結果牛傳染性鼻氣管炎抗體陽性牛716頭，陽性率22%。

緒 言

牛傳染性鼻氣管炎 (infectious bovine rhinotracheitis, IBR)，係由 Bovine Herpesvirus Type I (BHV-1) 所感染引起之牛急性熱性傳染病，本病常引致牛上部氣道及氣管粘膜之炎症，以呼吸困難及流鼻汁等為主要症狀，其他由於病毒之感染部位不同而發生腦炎、龜頭炎等性病、結膜炎、流產、乳房炎及小牛之髓膜腦炎等多種症狀之疾病^(1,2)，因本病毒具有持續感染之特性，故為世界各國備受重視之疾病。

本病在世界各國均有發生，在台灣於1967

年Otte⁽³⁾報告，從臨床以及疫情觀察認為有IBR之存在，至1974年林敬覆等⁽¹⁾報告本省中北部7縣市321頭牛中24頭（7.3%）為陽性牛，嗣後1975年林敬覆等⁽²⁾報告竹南鎮某牧場之6個月齡聖達肉牛病例初次分離到IBR病毒，以後雖有鍾明華⁽³⁾對台灣乳牛IBR中和抗體之調查報告，但未見有本病之發生報告病例，至10年後之1985年8月於屏東縣K牧場，在組織病理上呈現非化膿性腦脊髓炎及潰瘍性口炎之2頭斃死牛中分離到IBR病毒，翌年1986年在高雄縣再度爆發IBR造成南台灣之大流行，同時1987年亦因進口牛而引發IBR之流行，此兩次流行，傳播均甚迅速，

波及亦廣，造成農戶重大的損失，幸而能在短時間內分離病原成功而確診本病，繼而扼止本病之繼續為害，茲將本病在1986年與1987年兩次大流行的發生情形，病原分離及疫情調查之結果報告如下。

材料與方法

1. 發生情形及臨床所見：

本病之發生情形及患牛的臨床症狀等係引用自各縣市家畜疾病防治所的調查報告，及筆者等親赴高雄縣、雲林縣等發病酪農戶的直接觀察結果。

2. 病理學檢查：

高雄縣、雲林縣等地發病酪農戶呈牛傳染性鼻氣管炎症狀而死亡之牛隻，先依一般解剖，觀察並記錄其肉眼病變後，採材分離及固定於10%中性福馬林固定液中，待其固定後，經酒精脫水，石臘包埋切片，以H&E染色後，於顯微鏡下觀察其組織病理變化。

3. 細菌學檢查：

病死牛之各主要臟器皆以Trypticase Soy agar (Difoc) 或加5%馬血液之Trypticase Soy agar在平常狀況下或以Gas pak (BBL) 方法厭氧培養以分離病原菌。

4. 病毒分離與鑑定：

(1) 病毒分離：

對有流鼻涕與眼分泌物增加等類IBR之病例均採鼻粘液與眼結膜拭子。對因IBR死亡或流產者則加採臟器，製成10倍乳劑，分別接種BT細胞分離病毒，分離之病毒均以CPE及螢光抗體法證實為IBR病毒。

(2) 螢光抗體之製備：

抗IBR病毒之64倍中和抗體血清，乃免疫小牛製備而得，以33%飽和硫酸銨沉澱3次，透析後通過Sephacryl S-300 (Pharmacia) 管柱收集IgG段，並冷凍乾燥備用，螢光標示抗體製備時以0.25 M carbonate bicarbonate buffer (pH 9.0) 溶解IgG成20 mg/ml，同時再以每mg IgG與0.05 mg FITC的比

例加入螢光色素，在4°C混合過夜，再通過Sephadex G-25，收集第一段，即與螢光結合之IgG，並以牛肝粉處理2次，離心並以0.45 μ濾過後，以負80°C保存，使用前測定力價後稀釋使用。

(3) 電子顯微鏡之檢查：

從接種BT細胞產生CPE者，以10,000rpm遠心30分鐘，去除雜質後，再以90,000rpm氣動遠心10分鐘，取沈澱物以負染色檢查病毒顆粒。

5. 血清學之疫情調查：

(1) 血清來源：

收集1986年間南部流行IBR地區，高雄縣乳牛血清3,261頭，並收集同地區1985年之牛血清2,671頭，供為血清調查之用。

(2) 凝膠沈澱法 (Agar Gel Precipitin test, AGP) 抗原之製備：

依Pfeiffer等^(?)法略加修改後實施。即以病毒株接種於MDBK細胞，當CPE 90%時，收集細胞以3,000g離心20分，去除上清液，加入5倍量之Trypsin-Versene液，以超音波處理2分鐘，再經37°C水浴中攪拌3小時，再以20,000rpm遠心1小時，取上清液即為AGP抗原。

(3) AGP法之實施：

AGP用瓊脂為0.65% agarose，0.87% NaCl與0.05% NaN₃ (pH 7.2)，其操作以Ouchterlony雙向擴散法，即中央1孔置抗原(直徑4 mm)，周圍6孔(與中央孔距6 mm)置供檢血清，並置陽性與陰性血清對照於37°C感作24小時後判定。

結 果

1. 發生情形及臨床所見：

在1986年6月高雄縣首先發生牛傳染性鼻氣管炎後，隨即蔓延至高雄縣全縣與屏東縣，台南縣兩縣之酪農戶，至1987年2月又因進口牛放行後爆發牛傳染性鼻氣管炎，病牛遍及南投、雲林、台南、高雄等地，疫情更為嚴重。

野外病例之臨床症狀均以發熱，呼吸症

狀爲主徵，病牛常於發熱期間可見精神不振、食慾廢絕。患牛均會有流水樣性至黏稠之鼻漏及流涎的情形（圖1），部份的患牛因呼吸困難而將舌伸出口外開口呼吸（圖2）有些患牛亦會有結膜炎，同時眼分泌物增加，嚴重的病例則更造成鼻粘膜之潰瘍（圖3），眼睛之角膜炎與角膜潰瘍（圖4）。

在1986年調查之10酪農戶1,383頭乳

牛中，有156頭發病（表1），發病率介於4—35.4%之間，平均爲11.2%，未有牛隻死亡，產乳量下降5—40.0%，同期間調查高雄縣大社鄉IBR發生場之新生犢牛（表2），犢牛之發病率高達62%，而發病致死率達68.4%，發病之犢牛多有下痢症狀，其它主要爲呼吸症狀與結膜炎等。而1987年因進口牛引發之IBR，其發病率較

表1 台灣南部地區流行牛傳染性鼻氣管炎之發生調查（1986）

縣 別	鄉 鎮	發生時期	牧 場 (酪農戶)	飼養頭數	發病頭數(%)	死亡頭數
高 雄	路 竹	6.17	T	700	30 (4.28)	0
	大 社	7.12	C-1	141	50 (35.4)	0
	大 社	7.21	C-2	110	30 (27.2)	0
	大 社	7.26	C-3	56	15 (26.7)	0
	大 社	7.31	C-4	107	5 (4.7)	0
	大 樹	7.31	S	25	2 (8.0)	0
	橋 頭	12	L	70	5 (7.1)	0
	橋 頭	12	T	50	2 (4.0)	0
屏 東		8	K	100	10 (10.0)	0
台 南	鹽 水	8		24	7 (29.1)	0
計	3 10			1,383	156 (11.2)	0

表2 高雄縣大社鄉IBR污染場犢牛併發肺、腸炎疫情調查

鄉鎮別	畜主No	犢 牛 頭 數	發病頭數	死亡頭數	呼吸症狀	下 痢	結膜炎	IBRV 分 離
大 社	1	22	19	14	5	14	2	+
	2	2	2	2	2	2	0	NT*
	3	25	20	15	5	15	0	NT
	4	26	12	8	5	8	3	+
	5	25	20	14	2	14	0	NT
	6	25	16	13	5	13	2	+
	7	11	7	3	0	3	0	NT
	8	12	8	5	2	5	1	+
	9	22	2	1	0	1	0	NT
	10	9	3	1	0	1	0	NT
計	10	179	111	76	26	76	8	4
(%)			(62.0)	(68.4)	(23.4)	(68.4)	(7.2)	

*NT：沒做



圖 1 牛傳染性鼻氣管炎病牛有水樣性鼻漏及流涎



圖 2 部份患牛因呼吸困難而開口呼吸(舌頭伸出)



圖 3 牛傳染性鼻氣管炎在鼻腔粘膜造成之潰瘍(箭頭所示),流鼻涕及流涎



圖 4 牛傳染性鼻氣管炎嚴重病例造成之角膜炎與角膜潰瘍



圖 5 牛傳染性鼻氣管炎病牛於氣管粘膜表面所見之纖維素樣偽膜及出血潰瘍灶

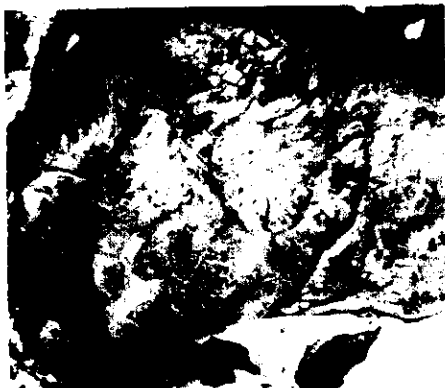


圖 6 部份病斃之牛隻有纖維素性肺炎及胸腔積水



圖 7 野外病例 162 號牛氣管粘膜局部壞死灶
H & E × 40



圖 8 氣管粘膜上皮層呈嚴重壞死灶,表面有纖維素覆蓋,多數炎症細胞浸潤於壞死周邊,部份並波及深部組織

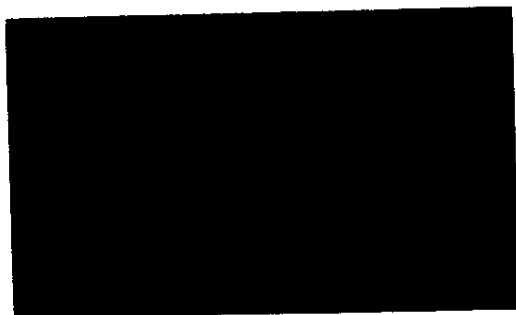


圖 9 野外病例 162 號牛肺：小支氣管腔及肺泡腔內可見多量嗜中性球浸潤。H & E × 40



圖 10 野外病例 162 號牛肺：多數嗜中性球及纖維素滲出物蓄積於肺泡腔內。H & E × 200



圖 11 (a) 野外病例 162 號牛鼻鏡皮膚呈局部潰瘍灶，多數潰瘍灶周邊的鱗狀上皮細胞有明顯的 Ballooning 變性。H & E × 40



圖 11 (b) 鼻鏡皮膚：局部潰瘍灶周邊部份鱗狀上皮細胞呈退行性變化，其上皮細胞核核膜濃染並可見嗜酸性核內包涵體（箭頭所指）H & E × 400



圖 12 野外 162 號病例之扁桃腺：局部化膿灶、壞死區周圍可見大量嗜中性球浸潤。H & E × 100



圖 13 部份病牛於腦部所見之圈管現象



圖 14 牛傳染性鼻氣管炎病毒感染牛辜丸細胞 48 小時所產生之圓形化細胞病變



圖 15 以電子顯微鏡負染色所檢出之 IBR 病毒 (×150,000)

表3 進口牛隻檢疫放行發生 IBR 及其蔓延情形 (1987)

縣	發生戶數	進口頭數	飼養頭數	發生頭數	死亡頭數 (%)	流產頭數 (%)
台北	3	-	252	22	-	-
南投	3	40	124	43	0	2 (4.65)
雲林	24	134	1,242	446	42 (9.42)	17 (3.81)
台南	6	97	288	43	6 (13.95)	0
高雄	43	276	1,389	498	70 (14.06)	35 (7.03)
台東	1	189	542	438	3 (0.68)	0
計	80	736	3,837	1,490	121 (8.12)	54 (3.62)

高(表3),有些酪農戶高達100%,同時造成一部份牛隻的死亡(平均8.12%)及部份流產,其中被波及之本省自產牛其發病率與死亡率稍低。

2. 病理學檢查:

(1) 肉眼病變:

胸腔積水約1,000ml,肋膜面有大小不同之出血斑,並有纖維素附着,咽喉頭至氣管全部粘膜覆蓋不潔黃色帶血樣纖維素性偽膜,氣管壁水腫,左右肺橫膈膜葉有多量纖維素附着。

扁桃腺化膿壞死,肺部淋巴呈髓樣腫脹2~3倍大,子宮內充滿赤褐色內容物。近鼻頭之兩鼻腔內側可見兩個直徑約1.5cm大之潰瘍灶,中鼻腔內有3個直徑0.5cm大之潰瘍灶,鼻甲介骨內存有暗綠色乾酪樣物,膀胱內壁輕度充血,其餘臟器未見病變。

(2) 組織病變:

鼻粘膜:多發局部潰瘍灶。

氣管:粘膜上皮層呈嚴重的壞死灶,表面並有纖維素覆蓋。多量急性炎症細胞浸潤於壞死灶周邊,部份並波及至深部組織(圖7-8)。

肺:化膿性支氣管性肺炎,肺組織之病變特徵有:

①小支氣管腔及肺泡腔內多量嗜中性球蓄積。(圖9)

②纖維素蓄積於大多數肺泡腔內。(圖10)

③小葉間隔,纖維組織明顯增生。

④纖維素性血栓,廣泛似地散佈於各血管腔中。

⑤肺實質區化膿性壞死灶呈多發性散佈。

鼻鏡皮膚:明顯的局部性潰瘍灶。呈潰瘍灶的鱗狀上皮細胞層已散失原有的構造而多量急性炎症細胞浸潤其間,並波及至真皮層。多處潰瘍灶周邊的鱗狀上皮細胞均呈明顯的Balloning degeneration且部份呈退行性變化的上皮細胞核之核膜濃染並可見嗜酸性核內包涵體。(圖11,a,b)

淋巴:明顯的壞死性、化膿性淋巴腺炎呈多發局部性散佈。

扁桃腺:Epithelial crypt及深部淋巴組織可見多發性粉紅色,均質樣壞死灶。(圖12)

腦:可見輕微之非化膿性腦炎(圖13)。

3. 細菌學檢查:

以各種培養基,如Tryptic Soy Agar或Blood Agar培養基,自腦、心、肝、腎、脾、淋巴腺等臟器分離病原菌,結果未分離到有意義的細菌,而在肺分離到的細菌,則有E. coli, Streptococcus, Pseudomonas及Klebsiella等細菌。

4. 病毒分離與鑑定:

對因 IBR 死亡的牛隻進行剖檢，同時分離病毒，結果發現組織內病毒分佈(表 4)，以鼻腔潰瘍部份力價最高($\geq 10^6$ TCID₅₀/ml)其次為扁桃腺、胎盤、氣管、粘液等，再其次如肺、鼻汁、咽喉頭、咽背淋巴、乳房淋巴，其分離到病毒而力價不高者如大腦、小腦、脊髓、腎等。

在 1986 與 1987 年兩次大流行期間，共

分離得 79 株(表 5)，其中以鼻汁分離率 64.3% (47/73) 較高，而眼分泌物亦有 33.3% (5/15) 之分離率，對於所分離之病毒，大部份於感染細胞後 10~48 小時呈現圓形化的 CPE (圖 14)，且均能以 IBR 螢光標示抗體染出核內螢光抗原，同時以電子顯微鏡負染色可見 Herpesvirus (圖 15)。

表 4 剖檢牛 IBR 病毒分離與其組織內分佈

分離部位	分離株	病毒力價 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)*	分離部位	分離株	病毒力價 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)*
鼻汁	3/3	3.0	肺	3/3	3.5~4.5
氣管粘液	2/2	3.0~5.0	腎	1/2	≤1.0
鼻腔潰瘍	1/1	≥6.0	肝	0/3	<1.0
咽喉頭	3/3	3.5	脾	0/3	<1.0
陰道分泌物	1/1	NT	扁桃腺	2/2	4.0~6.0
胎盤	2/3	≥5.5	顎下淋巴	0/2	<1.0
流產胎兒臟器	0/1	<1.0	咽背淋巴	2/3	3.0
大腦	2/3	≤1.0	肺門淋巴	0/2	<1.0
小腦	1/2	≤1.0	縱膈淋巴	0/2	<1.0
脊髓	1/1	≤1.0	乳房淋巴	1/2	3.5

* 均為 10% 乳劑

表 5 IBR 病毒分離成績

地區 (縣)	年	代	分離部位		臟器	計 (分離株)
			鼻汁 (%)	眼分泌物 (%)		
屏東	1986		ND	ND	4	4
屏東	1986		2/2*	ND	ND	2
高雄	1986.6.30		2/4	ND	ND	2
高雄	1986.7.21		23/30	5/15	ND	28
高雄	1986.8.11		4/6	ND	ND	4
高雄	1987.4.20		7/12	ND	12	19
台南	1986		1/2	ND	ND	1
雲林	1987.3.7		7/10	ND	11	18
台北	1987.4.15		1/7	ND	ND	1
計			47/73 (64.3)	5/15 (33.3)	27	79

* 分離株/樣品數

ND: 沒做

表6 凝膠免疫擴散法調查高雄縣乳牛之IBR抗體分佈

鄉鎮別	調查戶數	飼養頭數	調查頭數	陽性頭數(%)
大社	13	1,129	950	324 (35.8)
仁武	1	14	8	0 (0)
鳥松	2	87	65	0 (0)
大樹	4	58	55	2 (3.6)
杉林	1	74	74	35 (47.2)
美濃	1	6	6	0 (0)
燕巢	10	728	601	74 (12.3)
橋頭	19	1,052	798	132 (16.5)
梓官	2	76	74	7 (9.4)
瀾陀	3	88	71	0 (0)
路竹	2	702	559	142 (25.4)
計11	33/58*(57)	4,014	3,261	716 (22.0)

* 陽性戶數/調查戶數

表7 1985年與1986年高雄縣牛IBR抗體調查之比較

年	陽性酪農戶(%)	陽性牛隻(%)
1985	10/61*(16.4)	287/2671**(10.8)
1986	33/58(56.0)	716/3261(22.0)

* : 陽性酪農戶/採樣酪農戶

** : 陽性頭數/採樣頭數

5. 血清學之疫情調查:

在1986年IBR流行期間,以AGP法調查高雄縣58戶3,261頭牛血清,結果顯示有33戶(56.9%)716頭(22%)為IBR抗體陽性(表6),並追溯試驗1985年高雄縣之61戶2,671頭牛血清,發現有IBR抗體陽性者10戶(16.4%)287頭(10.8%),遠較1986年之IBR抗體陽性率為低(表7)。

討 論

雖然Otte⁽⁶⁾、林等⁽²⁾、鍾等⁽³⁾均有本省牛隻IBR之病例與抗體調查,但至今仍未有大流行病例之報告,本省於1986年與1987

年發生了兩次大流行,比較兩次之流行發現1986年在本地自己爆發之IBR未造成流產與死亡,同時發病率亦較低(11.2%),1987年因進口牛而流行之IBR其發病率較高同時造成平均8.12%的致死率及一部份孕牛之流產,此顯示流行毒株的差異造成不同的結果,雖然1987年進口牛因運輸等緊迫亦加重牛之病情,但由於本地牛亦會被感染而有流產、死亡等症狀,此亦可推測1987年流行之進口毒株,對台灣乳牛之致病性較強。

由於國外的文獻^(4,5)顯示本病毒除了有呼吸道的症狀(稱為IBR),亦可引發起膿疱性陰戶腔炎(Infected Pustular Vulvovaginitis, IPV),然本次調查均未發現有生殖道膿疱性的病變,病毒分離亦主要在鼻汁與眼分泌物分離而得,僅流產的病例可在生殖道分離到病毒,未發現有單純之IPV感染,推測由於IPV可能主要經由交媾時傳播病毒,其傳播速度較慢,此與呼吸道型IBR有所不同,故IBR大流行時,並不一定會發現IPV。

比較IBR病牛在鼻汁與眼分泌物之病毒分離率,發現病牛之鼻汁與眼分泌物均可分離到病毒,而以鼻汁之分離率較高(64.3%),此

結果與前人報告^(4,5)，建議鼻汁與眼分泌物分離病毒較佳相符。

1986年11月以免疫擴散法(AGP)調查高雄縣58戶3,261頭乳牛，結果發現33戶，716頭乳牛呈現AGP抗體陽性，各鄉鎮之陽性率分佈從3.6%至47.2%，平均為22%，與鍾等⁽³⁾1977年報告陽性率28.2%相比較增加甚多，由此推測IBR在本省污染情形已達普遍，抗體低時常因緊迫而發病流行，流行過後則可有一段時間有較高的抗體保護牛隻，如此不斷的循環消長。追溯1985年同地區61戶2,671頭牛血清發現IBR抗體陽性僅10戶(16.4%)287頭(10.8%)，較遠1986年為低，此亦證明本次IBR之大流行。

誌 謝

本報告之完成承蒙農委會鍾處長博、林科長再春、劉枝正永和及農林廳畜牧科簡科長明龍、陳股長秋麟、黃國青及蘇耀期先生之指導與鼓勵表示謝意，又疫情調查，病理解剖及病材之提供多承高雄縣、屏東縣、台南縣、雲林縣及台北縣等各家畜疾病防治所協助得以完成謹表謝意。對電子顯微鏡檢查多蒙本所黎南榮副研究員協助，組織病變檢查由本所病理研究室楊喜吟、張聰洲、李淑慧等各位同仁協助一併敬致謝忱。

參 考 文 獻

1. 林敬覆等。1974。台灣乳肉牛病毒性疾病IBR, PI-3及Adeno-1之抗體調查，台灣省畜衛試研報，11:57-62。
2. 林敬覆、邱朝齊、呂榮修、詹益波。1975。從罹患呼吸道疾病之牛隻分離IBR病毒及其性狀檢討。台灣省畜衛試研報12:61-68。
3. 鍾明華等。1977。台灣牛隻病毒性呼吸道疾病研究。I，牛隻微量血清中和抗體調查研究，台灣省畜衛試研報，14:65-72。
4. Gillespie, J.H. and J.F. Timoney. 1982. In "Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic Animals" 7th ed, PP. 552-560.
5. Kahrs, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update, JAVMA, 171: 1055-1064.
6. Otte, E., 1968. Virus disease of cattle in Taiwan. J. Taiwan. Ass. Anim. Husb and Vet. Med. 12: 1-22.
7. Pfeiffer, N.E. and I.A. Schipper. 1979. Evaluation of pseudorabies viral antigens in agar gel immunodiffusion test. AJVR. 40: 595-598.

Epidemiological Investigation and Virus Isolation of Infectious Bovine Rhinotracheitis in Taiwan

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) initially occurred at Kaohsiung in June, 1986, then, spread to Pingtung and Tainan, Eventually, the disease gradually disappeared. In 1987, the cattle were allowed to import and resulted in an outbreak of the disease again. IBR outbreaked in 1987 caused more adult cattle to be death and abortion when compared to that outbreaked in 1986, It was suggested that the viruses induced the outbreak of the disease in 1987 were more virulent. Seventy-nine strains of IBR virus were isolated during those two outbreaks.

The distribution of virus in organs of infected cattle was examined. The results showed that virus titers detected from the nasal lesions with ulcer (10^6 TCID₅₀/ml), tonsil, placenta and tracheal mucus were higher than those from others. The most predominant ratio of virus isolation was obtained from the nasal discharges (64.3%). The agar gel precipitation (AGP) test was made on 3261 serum samples collected from eachdiary cattle. The results indicated that 716 of 3261 samples with AGP antibody to IBR virus were detectable.