

24-3

## 本省牛丘疹性口炎之病毒分離血清學 調查及對牛人工接種試驗

呂榮修 廖永剛 楊喜吟 黎南榮 鄭懋勁 林地發  
李淑慧 李永林 李全 張聰洲 邱仕炎

### 台灣省家畜衛生試驗所

本省於 1985 年在中南部地區發現牛非化膿性腦炎病例之流行，經調查嘉義縣共有 7 個養牛戶發生，在 1024 頭中有 23 頭 (2.25%) 發病，其中 5 頭死亡，12 頭淘汰；並於其中一病例之腎臟分離到牛丘疹性口炎病毒。以分離之病毒製成凝膠沈降反應用抗原，經調查 1987 年本省 14 縣市 131 戶 2,313 頭牛血清，發現陽性戶有 81 戶，陽性牛有 457 頭 (19.75%) 其中以台東縣和高雄縣之陽性率最高 (52.02% 及 47.69%)；又其他各縣市亦顯示抗體分佈甚廣。

以分離之毒株對牛進行人工接種試驗，結果 3 頭接種牛均於接種部位粘膜形成丘疹性潰瘍。並由粘膜潰瘍病灶回收病毒，其腦亦呈現非化膿性腦炎之組織病變。

本文為本省首次之牛丘疹性口炎病毒分離及抗體調查報告。

牛丘疹性口炎引起牛口腔粘膜，鼻鏡，鼻腔粘膜，口唇及口部周圍形成丘疹性病灶為特徵的慢性局部性疾病。

本病最初由 Degive<sup>(8)</sup> 於 1844 年發現，並稱為 *Stomatitis papillaris*。及至 1906 年 Von Ostertag and Bugge<sup>(10)</sup> 經過詳細的臨床及組織病理的研究報告，稱為 *Stomatitis papulosa bovis specifica*。

丘疹性口炎發生於歐洲以外，肯亞，奈及利亞，美國，澳洲及日本等地亦有發生報告<sup>(2, 6, 9)</sup>。

在我國的發生係由吉川<sup>(4)</sup> 最初報告，係於 1928 ~ 1929 年在中國大陸東北地區及蒙

古一帶發生的 138 個病例進行發生調查，人工接種試驗及組織病理的研究。

本病在台灣尚無人報告，但於 1985 年 6 月在嘉義縣內乳牛場突然發現 4 至 12 個月齡小牛相繼發生非化膿性腦炎的病例，又發現在雲林，南投及屏東地區等養牛場，疫情至為嚴重。

本所為探討病因，曾對病死牛進行病毒分離，結果由嘉義縣一病例分離到牛丘疹性口炎病毒，為瞭解本病在台灣抗體分佈及分離毒的病原性而進行各項試驗，供為今後防疫措施之參考。

## 材料與方法

### 一、疫情調查：

在嘉義縣轄內調查發生不明原因傳染病之酪農戶之飼養、發生及死亡等情形資料加以整理，如有病斃牛並做病理解剖，微生物學及組織病理學之探討。

### 二、病毒分離：

嘉義縣酪農戶2戶之3頭小牛，經剖檢前採取500 ml 脫纖維血，斃死後採取主要臟器，如腦、氣管、肺、肝、脾、腎、脊髓，各淋巴結，經製成10倍乳劑離心處理後接種於牛睪丸初代細胞，甲狀腺細胞及MDBK等繼代細胞，並觀察5代有無細胞病變，採取之毒血亦接種50 ml 於健康小牛（6個月齡）1頭及各以10 ml 接種於6隻家兔之靜脈內觀察14日。

### 三、牛人工接種試驗：

選用3頭牛丘疹性口炎抗體陰性牛，其年齡為8至10月齡，以嘉義株（BT 4代） $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 病毒液0.2 ml分別接種於口腔及鼻腔粘膜，並觀察至5日後，將其中1頭撲殺供為病理組織學檢查及病毒分離，其餘2頭繼續觀察並採血測抗體至1個月以上。

### 四、凝膠沈降反應（AGP）抗原製備：

AGP 抗原之製備仿鍾<sup>(3)</sup>，以嘉義分離毒株，經牛睪丸細胞增殖，當細胞病變達80~90%後收集冷凍，經冷凍，解凍3次後，以1,500 rpm遠心20分鐘，取病毒上清液，再以每100 ml 病毒液加入42.5 g 硫酸銨於4℃冰箱攪拌一夜，翌日以6,000 rpm 遠心30分鐘，取沈澱物以PBS溶解，放入透析袋中以PBS 透析至袋外無硫酸銨為止。取出透析袋以PEG (M.W: 20,000) 行膜外濃縮至病毒原液之1/80，然後再以含0.14 M NaCl之0.05M tris buffer (pH:7.2) 透析，每30分鐘換液一次，共換液5次後，取濃縮液再以1,500 rpm 遠心15分鐘，去除沈澱物，取上清液即為AGP抗原。

### 五、AGP法實施：

AGP用凝膠為1.25公克Bacto-agar 加入100 ml 8%食鹽水中，以110℃ 10分鐘滅菌，待冷卻至約50℃分裝於平皿中（高

度約0.2 cm）。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（距中央孔距6 mm）置供檢血清，並置陽性與陰性血清對照於37℃ 潮濕箱中感作24小時後判定。

### 六、供檢血清來源：

1987年在各縣市收集的牛血清共2,313頭供為抗體調查用。

## 結 果

經調查嘉義縣轄內養牛戶所發生牛不明原因傳染病之疫情，結果如表1所示，共有7戶養牛戶發生，患病頭數共23頭，其中5頭死亡，12頭淘汰，6頭治療。

患牛之臨床症狀為初期有食慾減少，體溫39.5℃~40.7℃，呈散發性發生，患牛發生緩慢或突發性四肢軟弱有時可見肌肉顫抖痙攣現象發生，隨即患牛不能站立，而屈膝臥下，甚而無法自行翻動身體，病牛口腔及鼻腔分泌液增加，在口腔齒齦及鼻腔粘膜有潰瘍形成，眼睛有白濁現象，部份患牛經過一段時間後自然痊癒。

剖檢牛隻在肺之心葉及膈葉發現有輕度肺炎病變，在口腔、齒齦及鼻粘膜有潮紅及潰瘍病變，鏡檢時可見粘膜上皮細胞壞死及脫落並有少量嗜中性球及單核細胞浸潤。腎臟則在髓質部有輕度鬱血，鏡檢下在皮質部發現有腎小管擴張及少量淋巴球浸潤，又在大腦及小腦於鏡檢時皆見有瀰漫性淋巴球圍管現象及神經膠質細胞增生，尤以腦幹部最為顯著，亦即有非化膿性腦脊髓炎之病變，另外在眼之虹彩及角膜發現有多量嗜中性球浸潤。

微生物學檢查：以Tryptic Soy agar 及含5%馬脫纖維血液培養基，自剖檢牛隻肝、腎、脾、肺、腦及淋巴結等各臟器嘗試分離病原菌。結果均未分離到有意義之病原菌，又採取剖檢各臟器製成乳劑，接種於小牛初代睪丸細胞及BEK株化細胞，經繼代3~4代後，以電子顯微鏡證實由其中一病例之腎臟分離到牛丘疹性口炎病毒（圖1），另一病牛則分離到牛腸道病毒。

惡性卡他熱病毒分離：採取2病例之病牛

表 1 嘉義縣乳牛不明原因傳染病疫情調查 (調查期間74.5.15~6.25)

鄉鎮別	酪農戶姓名	飼養頭數	發生年月	患病頭數	患病經過			發病年齡	病理及病毒分離檢查
					死亡	淘汰	治療		
大林鎮	張	乳公牛 23 肉牛 64	74.6.20	乳公牛 2 肉牛 4	1	3	2	6~10 個月	未檢查
大林鎮	張	乳牛 110	74.5.20	3	1	1	1	6~10 個月	未檢查
大林鎮	江	乳牛 56 肉牛 64	74.6.7	乳牛 1		1		6~10 個月	未檢查
民雄鄉	陳	乳牛 168	74.6.12	3	1	2		4~8 個月	非化膿性腦脊髓炎、肺膿腫， 肝臟分離到腸道病毒。
民雄鄉	周	乳牛 72	74.6.10	4	2		2	4~8 個月	虹彩炎、結膜炎、潰瘍性口 炎、非化膿性腦脊髓炎、腎 臟分離到丘疹性口炎病毒。
民雄鄉	黃	乳牛 165	74.6.14	3		2	1	4~8 個月	未檢查
太保鄉	六興 牧場	302	74.5.15	3		3		6~12 個月	未檢查
合計	7 戶	1024		23 (2.25%)	5	12	6		

表 2 1987 年台灣牛丘疹性口炎抗體調查 (AGP Test)

縣市別	調查戶數	陽性戶數	調查頭數	陽性頭數	陽性牛比率 (%)
雲林縣	10	5	203	9	4.43
高雄縣	10	9	195	93	47.69
臺南縣	5	4	93	25	26.88
臺東縣	10	10	198	103	52.02
臺北縣	10	6	198	22	11.11
彰化縣	10	4	192	18	9.37
南投縣	13	6	197	16	8.12
新竹縣	6	1	98	3	3.06
桃園縣	11	5	196	10	5.10
臺南縣	10	8	193	35	18.13
嘉義市	3	0	30	0	0.00
嘉義縣	12	8	120	29	24.16
苗栗縣	11	7	200	41	25.00
屏東縣	10	8	200	53	26.50
總計	131	81	2313	457	19.75

血液 50ml 各靜脈接種 1 頭健康小牛，觀察 14 日未見有異狀，另以 10ml 之發病牛血液靜脈接種 6 隻家兔，結果只有一隻一週後有發熱現象，經採取血液再繼代家兔 2 頭後，再觀察 14 日未見有發熱等臨床症狀而停止繼續繼代。

惡性卡他熱中和試驗：取發病牛之耐過血清〈病後 3 週〉與惡性卡他熱病毒進行中和試驗，結果不中和而為陰性。

人工接種試驗：3 頭牛於接種病毒 24 小時後體溫升高至 39℃ 以上，而在接種後第 3 日在口腔粘膜發現有針頭大紅疹出現，並由紅疹漸漸形成潰瘍病灶（圖 2，3）。接種牛體溫升高至 39℃ 以上持續約一星期，而潰瘍病灶則逐漸擴大直徑達 0.5 公分左右，並持續至 2 星期之久才漸漸消失。而牛產生 AGP 抗體是於接種後 24 日才測得陽性；並持續達 4 星期之久。

檢查撲殺接種牛之病變：僅於口腔及鼻粘膜有潰瘍病灶，其餘臟器外觀正常。而在病理組織切片下可見口唇粘膜上皮細胞壞死脫落形成潰瘍（圖 4），在潰瘍灶周圍的上皮細胞呈明顯的水腫變性，其附近深層組織有多量的中性球和單核球浸潤，同時在口唇變性細胞質內見有許多大小不一的嗜伊紅性包涵體（圖 5），經以電子顯微鏡之超薄切片檢查，可見許多病毒顆存在（圖 6）另外在大腦及小腦做病理組織等檢查時，皆見有瀰漫性淋巴球圍管現象及非化膿性腦炎的病變（圖 7）。

而對撲殺牛之微生物檢查也如同上述之步驟；分別在細菌學及病毒微生物上探尋，但僅於潰瘍粘膜乳劑，經接種小牛睪丸細胞 2 至 3 代後有明顯之 CPE 產生，並以電子顯微鏡證實是牛丘疹性口炎病毒。

AGP 抗體調查：全省 14 縣市 131 戶 2, 313 頭牛血清測得結果如表 2 在所測試的 131 戶中有 81 戶為陽性，而陽性牛有 457 頭 (19.75%)，其中以台東縣和高雄縣之陽性率最高，分別為 52.02% 及 47.69%；又其他縣市之調查結果亦顯示抗體分佈甚廣。

## 討 論

本省於 1985 年 5 月以來，雲林縣有 2 個

病例，嘉義縣 3 個病例，南投縣 1 個病例，桃園縣 2 個病例，屏東縣 2 個病例，經由筆者等作病性鑑定，均呈非化膿性腦炎或伴有潰瘍性口炎等組織病理變化，所有病例均呈中等度至重度之瀰漫性淋巴球圍管現象及神經膠細胞之增殖或聚集等非化膿性腦脊髓炎，部份病死牛在臨床上之口腔糜爛及潰瘍病變，又部份牛隻在臨床上眼睛白濁，鏡下呈虹彩炎及結膜炎。因為引起如上所述疾病的病例過去在台灣很少見，因此頗引起各研究者之間的重視與著手調查，據本病例所顯出的非化膿性腦炎的病徵，一度曾被懷疑是否由假性狂犬病或惡性卡他熱等疾病所引起。

筆者等主以嘉義、南投、雲林、桃園及屏東等解剖病例所收集之病例進行病毒分離，結果從嘉義縣 3 個病例的 1 個病例 (No. 52) 的腎臟分離到牛丘疹性口炎病毒，另外自屏東病例分離到牛傳染性鼻氣管炎病毒成功，對惡性卡他熱病毒或假性狂犬病病毒均未能分離到，由以上之成績顯示 1985 年在野外發生呈非化膿性腦炎的疾病應有牛丘疹性口炎及牛傳染性鼻氣管炎的存在。

一般對牛丘疹性口炎之病毒分離或病原學診斷均採取丘疹病變部以電子顯微鏡檢驗，或使用宿主細胞如牛睪丸，牛腎臟或牛肺等各種細胞分離病毒，本病例僅能從腎臟分離到牛丘疹性口炎病因而之副痘病毒 (Parapoxvirus) 實屬特例。

牛丘疹性口炎對小牛較易發生，其傳播力甚強，但死亡病例甚少。然因本病的病變與口蹄疫，水疱性口炎等初期病變類似，因此對海外惡性傳染病的防疫對策上，本病在台灣的存在，值得重視。

又 Carson 及 Kerr<sup>(7)</sup> 報告，本病也會感染人，如以人畜共同傳染病的觀點而言，本病亦為不容忽視的疾病。

為瞭解分離之病毒對台灣乳牛之病原性，經人工接種試驗結果顯示，對接種牛之病原性甚強。發熱，丘疹之形成均與先人所報告者均能吻合<sup>(5,6,7,9)</sup>，又組織病理的變化；口唇粘膜的潰瘍病灶可見上皮細胞的變性壞死及包涵體的形成亦與諸報告者一致<sup>(5,6,9)</sup>，但對於腦

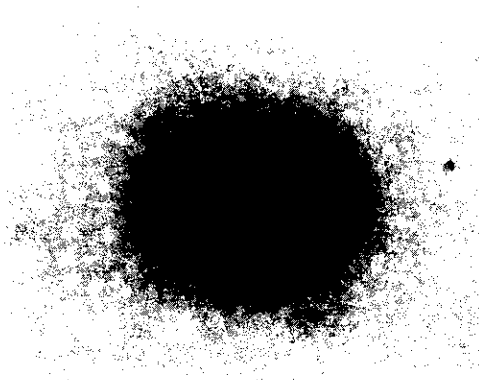


圖1 電子顯微鏡負染色拍攝之牛丘疹性口炎病毒 (X 100,000)



圖2 牛下唇粘膜接種後5天出現丘疹性潰瘍病灶。(接種後5日)



圖3 牛齒齦面的潰瘍病灶。(接種後5日)

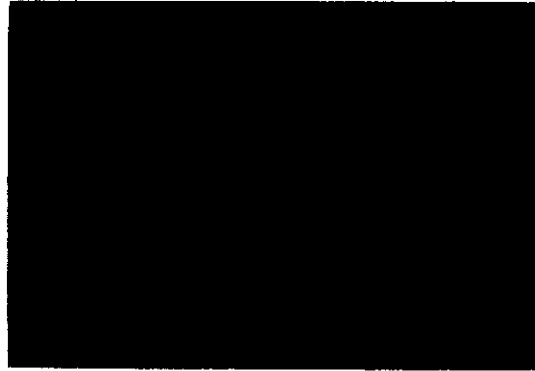


圖4 病理切片下唇部粘膜上皮壞死脫落形成潰瘍。20 X, H&E染色。

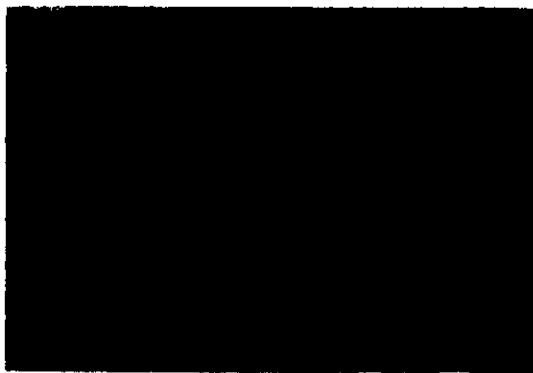


圖5 口唇部變性細胞質內有嗜伊紅性包涵體。20 X, H&E染色。

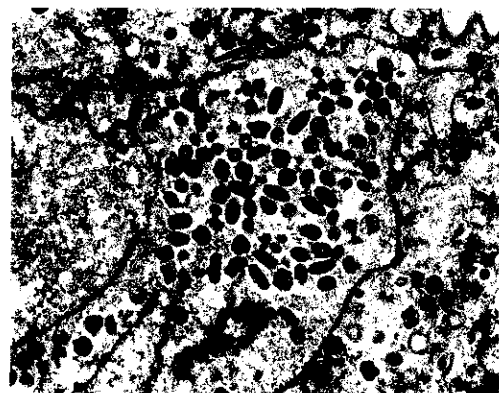


圖6 潰瘍上皮細胞包涵體以超薄切片檢視之病毒顆粒 (X 20,000)

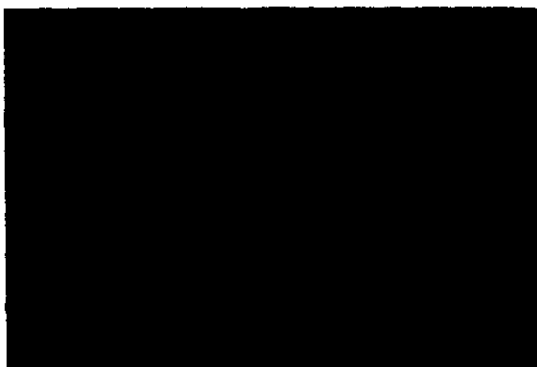


圖7 嘉義株人工接種牛大腦呈瀰漫性淋巴球圍管現象 (H&E stain x 400)

組織病變均未見有記載，此次試驗牛的大腦及小腦在鏡下均能觀察到非化膿性腦炎像，此發現可引證在 1985 年於中南部發生於小牛之間的非化膿性腦炎，本病可能亦為其原因之一。

以抗體調查本病之陽性率介於 4.5 ~ 52 %，平均為 19.75 %，且抗體之分佈甚廣，遍佈全省各縣市，此應是否本省種牛均來自本病之發生地區如澳洲及美國等地所引進有關。Boxton and Fraser<sup>(6)</sup> 曾報告，由初期感染後耐過之牛，經數週至數個月之後，曾經再發的事實而言，以保毒牛引進的機會甚大，且以發病牛之唾液及鼻汁中含有多量之病毒，除接觸感染之外，尚藉餵乳，飼料或牧草以及其他用具所傳播以致本省牛隻受到顯性抑或不顯性感染導致抗體分佈至為廣大，因此對本病之診斷及防疫應加以重視。

### 參考文獻

1. 林政吉。1986。嘉義縣牛丘疹性口炎病因之探討及疫情調查。75 年度臺灣省各縣市家畜疾病防治所調查研究報告。
2. 賴秀穗。1984。牛丘疹性口炎。家畜禽新病例診斷手冊。臺灣省家畜衛生試

- 驗所印行。淡水。台灣，P 67 ~ 70。
3. 鍾明華。1979。微量免疫擴散法與中和試驗對豬假性狂犬病血清抗體測定比較。中華民國獸醫學會雜誌，vol. 5 P 67 ~ 70。
4. 吉川政市。1932。滿蒙に發生せる牛の傳染性丘疹性口炎に關する研究。日本獸醫學會雜誌第 11 卷第 1 號，P. 1 ~ 11。
5. 清水實嗣。1980。牛丘疹性口炎。牛病學。大森常良等編。近代出版。東京，P. 381 ~ 385。
6. Boxton A and G. Fraser. 1977. Bovine Papular Stomatitis Animal Microbiology Vol.2 691-692, Blackwell Scientific Publication Oxford.
7. Carson C.A. and K.M.Kerr.1967. Pseudo-cowpox in dairy cattle J. Am.Vet.Med.Assoc. 151:183-187.
8. Degive. 1884. Spezielle Pathologie u. Therapie der Haustiere 6 Aufl. Bd. 2, S. 11, Dasselbst; Ansteckende Papulöse Maulentzündung der Rinder.
9. Gillespie and Timoney. 1982. Bovine Papular Stomatitis Hagan and Bruner's Infectious Disease of Domestic animal 7 th edi. P. 547-548.
10. Ostertag u. Bugge. 1906. Untersuchungen über eine maulseucheähnliche. Erkrankung des Rindes ("gutartige Maulseuche", stomatitis papulosa bovis specifica). Zeitschr. f. Inf.Krankh, d Haust. Bd.1, S. 2-20.

**VIRAL ISOLATION, SEROLOGICAL INVESTIGATION AND  
EXPERIMENTAL  
INOCULATION OF BOVINE PAPULAR STOMATITIS (BPS)  
IN TAIWAN**

Y.S. Lu, Y.K. Liao, S.Y. Yang, N.J. Li, M.J. Kwang, D.F. Lin  
S.W. Lee, Y.L. Lee, C. Lee, J.C. Chang and S.Y. Chiu.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The outbreaks of bovine nonsuppurative encephalitis were observed in southern counties of Taiwan in 1985. At that time, 1024 heads of cattle in 7 farms were investigated in Chiayi county. Twenty-three of 1024 (2.25%) heads showed clinical signs of the disease. Five of 23 died and 12 of 23 were slaughtered. Furthermore, one Bovine Papular Stomatitis (BPS) virus was isolated. The virus was used to prepare the antigen for agar gel precipitation (AGP) test for antibody prevalence investigation. The total of 2313 serum samples collected from 131 farms located in 14 different counties in 1987 were tested by AGP positive reaction was obtained on 457 serum samples from 72 farms. The results indicated that BPS had been extensively present in most counties and the positive rate was 52.02 and 47.69% in Taitung county and Kaohsiung county respectively.

Three cattle were experimentally inoculated with isolated BPSV. The ulceration was observed on the site of inoculation and nonsuppurative lesion of brain was also noticed. This was the first report on the virus isolation and serological investigation of BPSV in Taiwan.