

牛白血病診斷液之研製及台灣地區疫情調查

楊揚輝 吳義興 蕭終融 李新進 黃金城
廖述吉 李淑慧 張惟茗 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

以牛白血病病毒持續感染 FLK 細胞之培養液，調製而成之瓊脂凝膠免疫擴散法診斷用抗原，可大量製造供檢查陽性牛之需。

1987 年調查本省 31,581 頭乳牛血清，陽性率介於 0% (宜蘭縣)~40.74% (新竹市)，平均為 17.31% (5466/31581)。陽性率超過 20% 者有 9 縣市，且其陽性率有急劇增加之趨勢。黃牛、水牛與鹿尚未發現陽性例 (0/64, 0/44, 0/162)；乳山羊之陽性率為 0.84% (17/2028)，值得重視。

牛白血病又稱為地方性牛白血病 (Enzootic bovine leukosis 簡稱 EBL)，是由牛白血病病毒 (Bovine leukemia virus 簡稱 BLV) 所引起的淋巴組織腫瘤性疾病。1969 年 Miller⁽¹⁷⁾ 等人，由患有惡性淋巴腫瘤的牛首次發現本病，本病旋即成為全世界養牛業者所共同面臨之重要問題。

感染牛會產生特異性的抗體，因此可藉檢測血中抗體來調查牛群的感染情形。常用的血清學方法有瓊脂免疫擴散法 (Agar gel immunodiffusion test 簡稱 AGID)，補體結合反應、免疫螢光法 (Immunofluorescence)、放射性免疫分析法 (Radio immunoassay)、融合抑制試驗 (Syncytia inhibition assay)⁽¹⁸⁾ 及酵素結合免疫吸附法 (ELISA)⁽¹⁹⁾ 等，但由於 AGID 法操作簡便，具實用性、特異性，因此成為廣被應用的方法⁽⁶⁾。

張等^(1,2,3,4) 及王等⁽⁵⁾ 曾對本省牛隻感染本病之情形做初步調查，得知本病在本省之感染情形嚴重。由於罹患本病之牛隻會產生抗體，成為抗體陽性牛，其感染持續而成為傳播者，且會在體內各器官發生腫瘤而致死⁽²⁰⁾，

因此對台灣養牛事業之潛在威脅很大。

為究明本病在台灣地區感染之情形，特進行本試驗，開發 AGID 之診斷抗原，並全面性調查牛隻之感染情形。此外，尚對其他反芻獸 (鹿、乳羊、黃牛及水牛等) 做初步調查。

材料與方法

1. 受檢血清：

由各縣市家畜疾病防治所，轉送 76 年度第一期或第二期牛布氏桿菌陰性反應之血清及鹿、乳羊、黃牛及水牛之血清。

2. 陽性血清：

含有 gp 及 p 兩種抗體之標準血清係由日本農林水產省家畜衛生試驗場分讓。並由台大王燭辰博士分讓標準血清及抗原供作參考。另將採自牛白血病抗體陽性乳牛血清經調整後做為對照陽性血清之用。

3. 免疫擴散試驗用抗原之製備及其力價測定：

依照 Onuma⁽²⁰⁾ 等之方法，將 BLV 持續感染 FLK 細胞培養液做為病毒抗原之材料。將上述培養液經 7,000 rpm 30 分鐘離心，上清液加入 0.05% 之 N-Acetylthyleneimine (AEI) 為不活化劑，經 37°C 24 小時

不活化後，每 100 ml 之培養液加入 30 g 之硫酸銨塩析後，把其沈澱物浮游於 PBS，再以 PBS 透析後以聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 濃縮到原來材料的 1 / 150 量，此精製抗原則含有醣蛋白抗原 (g p 抗原) 與蛋白抗原 (p 抗原)。

將製備之抗原做 2 倍稀釋，除中央小孔滴下標準血清外，其他小孔滴下各稀釋階段之抗原。以出現沈降線的最末釋濃度為一單位來設定抗原單位。

4. 免疫擴散法試驗：

置 0.8 % Agarose 15 ml 於直徑 9 cm 之塑膠培養皿做成凝膠層，各培養皿用穿孔器打出 8 組反應孔組，小孔邊緣與邊緣之間隔均為 3 mm，每組中央小孔滴下 4 單位之抗原，周圍 6 孔任選 2 個對稱小孔滴下陽性對照血清，其餘 4 孔滴下受檢血清。每小孔滴入之抗原或對照血清量均為 0.03 ml，置密閉箱內於室溫三天後判定之。

試驗結果

抗原力價測定：

由本實驗所製備的 2 批抗原，經測定後其力價介於 4 - 8 單位之間。經調配成 4 單位，以進行抗體調查。

BLV 抗體調查：

此次進行台灣地區乳牛白血病抗體調查，除基隆市、台北市及花蓮縣未送血清外，共包括本島 19 縣市，總頭數為 31,581 頭，陽性率為 17.31 % (5,466 / 31,581)。陽性率最高者為新竹市 40.74 % (165 / 405)，最低為宜蘭縣 0 % (0 / 8)。陽性率超過 20 % 者計有 9 縣市，依序為新竹市 40.74 % (165 / 405)。台東縣 32.65 % (111 / 340)。台中市 29.23 % (57 / 195)。新竹縣 27.62 % (87 / 315)。嘉義市 27.21 % (83 / 305)。嘉義縣 26.63 % (506 / 1900)。苗栗縣 21.25 % (63 / 2965)，桃園縣 21.24 % (447 / 2105) 和高雄市 20.70 % (59 / 285)。19 縣市中除宜蘭縣未發現陽性病例外，其餘 18 縣市均有本病之污染 (如表一)。

表一 台灣地區牛感染牛白血病之抗體調查
(用 AGID 方法)

縣市別	送檢血清數	陽性反應數	陽性率 (%)	備註
台北縣	1,487	216	14.53	
宜蘭縣	8	0	0	
桃園縣	2,105	447	21.24	
新竹縣	315	87	27.62	
苗栗縣	2,965	630	21.25	
台中縣	1,803	328	18.19	
彰化縣	2,134	246	11.53	
南投縣	597	97	16.25	
雲林縣	2,727	255	9.35	
嘉義縣	1,900	506	26.63	
台南縣	7,152	1,234	17.25	
高雄縣	2,528	503	19.90	
屏東縣	3,668	350	9.54	
台東縣	340	111	32.65	
新竹市	405	165	40.74	76年第二期血清
台中市	195	57	29.23	
嘉義市	305	83	27.21	
台南市	662	92	13.90	
高雄市	285	59	20.70	76年第二期血清
合計	31,581	5,466	17.31	

對新竹縣及台南市兩污染地區，進行追蹤調查，結果如表二，檢測相隔約半年的兩期不同血清，新竹縣陽性率由 27.62 % (87 / 315) 增至 39.70 % (183 / 461)，台南市則由 13.90 % (92 / 662) 增至 23.31 % (145 / 622)。

表二 牛白血病污染地區之追蹤調查

縣市別	血清期別	送檢血清數	陽性反應數	陽性率 (%)
新竹縣	I	315	87	27.62
	II	461	183	39.70
台南市	I	662	92	13.90
	II	622	145	23.31

對污染地區之牧場，調查其污染牧場數，結果如表三，9 縣市中，牧場總數為 452 場，其污染率為 57.08% (258/452)。污染率超過 50%者計 7 縣市，依序為台中市 100% (6/6)，台南市第二期血清 89.47% (17/19)，嘉義縣 83.93% (47/56)，苗栗縣 81.97% (50/61)，台南市第一期血清 73.68% (14/19)，台東縣 62.5% (10/16)，嘉義市 58.33% (7/12) 和 新竹縣 50% (7/14)。

表三 牛白血病污染地區牧場污染情形之調查

縣市別	牧場數	污染牧場數	污染率 (%)
台中市	6	6	100
台南市 (II)	19	17	89.47
嘉義縣	56	47	83.93
苗栗縣	61	50	81.97
台南市 (I)	19	14	73.68
台東縣	16	10	62.5
嘉義市	12	7	58.33
新竹縣	14	7	50
彰化縣	151	63	41.72
雲林縣	98	37	37.76
合計	452	258	57.08

其他反芻動物感染牛白血病之調查結果如表四及表五。檢查乳羊、黃牛、水牛及鹿之血清，僅乳羊有陽性病例，其陽性率為 0.84% (17/2028)。其餘三種動物均未有陽性病例 (表四)。乳羊血清樣本來自 7 縣市，血清總數為 2,028 例，陽性例為 17 例，分佈於台北縣、台中市和台南縣三地區，其陽性率分別為 3.45% (1/29)、1.62% (3/185) 和 1.22% (13/1063)。其餘四縣市未發現陽性例 (如表五)。

表四 其他反芻動物感染牛白血病之調查

動物別	送檢血清數	陽性反應數	陽性率 (%)
乳羊	2,028	17	0.84
黃牛	64	0	0
水牛	44	0	0
鹿	162	0	0

表五 乳羊感染牛白血病之調查

縣市別	送檢血清數	陽性反應數	陽性率 (%)
台北縣	29	1	3.45
台中市	185	3	1.62
台南縣	1,063	13	1.22
嘉義縣	87	0	0
台南市	60	0	0
新竹縣	170	0	0
高雄縣	434	0	0
合計	2,028	17	0.84

討 論

本試驗所製備之抗原，與日本標準血清作用，發現其特異性及敏感性均高。其抗原含有 g p 及 P 兩種抗原，依小山⁽⁶⁾等之報告，P 抗原之力價通常為 g p 抗原之兩倍，且相當安定，如使用高力價抗原時，對低力價抗體之檢查有所困難，而使用低力價抗原時，則其沉降線不明顯，而判定困難。本實驗進行抗體調查時，採用 4 單位之抗原力價，效果很好。又感染牛中 g p 抗體比 P 抗體較早出現，在 g p 抗體陽性牛中 P 抗體陽性牛僅為 19.7%，而 g p 抗體陰性牛中未檢出 P 抗體陽性牛。此次調製之抗原，僅做全面性抗體調查之需，故未對

做更進一步之檢討。

由表一結果知，除宜蘭縣以外，其餘各縣市均有陽性病例的發生，陽性率超過 20 % 者有 9 縣市，由此可知台灣地區已嚴重污染本病。

張等於 1982 年⁽¹⁾曾對本病之疫情以桃園縣及新竹縣做初步調查，其陽性率為 13 % (55 / 500)。王等⁽²⁾自 1978 年至 1980 年間所收集的乳牛血清中，陽性率為 16.7 % (111 / 1855)，且其陽性乳牛有 89 % (99 / 111) 是分佈於台灣北部，但此次調查，南部地區亦有很高的陽性率，由此可見本病已全面污染本省。相隔五年，本次調查中，桃園縣及新竹縣的陽性率都升高至 21.23 % 及 27.62 % (表一)。張等⁽³⁾於 1986 年調查台灣地區 15 縣 5 市之結果，陽性率為 5.8 % (1277 / 22,190)，僅宜蘭縣為陰性反應，本次調查中宜蘭縣亦無發現陽性病例。此次調查陽性率為 17.31 %，較 5.8 高出許多，因張等係將 AGID 之檢查技術傳授給各縣市防治所後，就地由各防治所檢查後之統計成績，而本所則收集血清集中在本所做 AGID 反應同時為免產生個人判定之誤差，結果判定由固定一人行之，故雖僅相隔一年，陽性率高出將近 3 倍，除了時間因素外，個人判定之誤差，是不可忽略的重要因素。

本次調查中亦發現，在相隔半年後，新竹縣之陽性率由 27.62 % (83 / 315) 增至 39.69 % (183 / 461)，而台南市則由 12.38 % (92 / 662) 增至 23.31 % (145 / 622) (表二)。台南市之污染牧場數也由 14 場增至 17 場 (表三)，由此可見，本病有蔓延之趨勢。Honma 等⁽¹²⁾及大島等⁽⁷⁾之報告，若將陽性牛繼續飼養而不加淘汰其陽性率會急劇增加，曾有牧場由 2.9 % 增至 27.5 %，由此可知，患牛是最大的感染源。張等⁽¹⁾亦發現，若不淘汰患牛，則患牛可成為感染源，經由吸血昆蟲之媒介而傳播本病。此外，亦可因食入患牛所泌之乳汁⁽⁸⁾，或因去角⁽⁹⁾和打耳號⁽¹⁵⁾等與患牛行機械性接觸而傳播本病，使感染率增高。

Onuma 等⁽¹⁹⁾之報告，北海污染本病的 Towada 地區，其乳牛抗體陽性率為 32.2 %

(363 / 1,127)，而本調查中亦發現新竹縣、台東縣及台中市之陽性率均在 30 % 以上，由此可見本省本病之高污染的情形，此外，本次調查中污染地區牧場之污染率高達 57.08 % (258 / 452)，其中台中市之牧場呈全面污染 100 % (6 / 6) (表三)，亦足以證實本省污染本病的嚴重性。

本病亦可因經人工接種血管而感染乳牛或綿羊^(10,11)，因此，本實驗亦包括了其他反芻動物感染本病之初步調查，結果黃牛 64 例、水牛 44 例及鹿 162 例均為陰性 (表四)，此結果亦與王等⁽²⁾之報告相符。然本調查中，7 縣市的乳山羊共 2,028 例，陽性率 0.84 % (17 / 2,028)，其中以台北縣 3.45 % (1 / 29) 最高，台中市 1.62 % (3 / 185) 及台南縣 1.22 % (13 / 1,063)，而嘉義縣、台南市、新竹縣及高雄縣均無陽性病例 (表五)，其疫情及患羊宜進一步探討或取材研究。

本病至目前為止尚無治療方法與有效之疫苗，雖非法定傳染病，但若不採取防疫措施將為害養牛事業，值得有關單位重視。

參考文獻

1. 張政宏、王燭辰，1982：72 農建-4.1-產-63 試驗報告。
2. 張政宏、王燭辰，1983：73 農建-4.1-產-85 試驗報告。
3. 張政宏、王燭辰，1984：74 農建-4.1-畜產-79 試驗報告。
4. 張政宏、王燭辰、許天來，1985：75 農建-7.1-牧-16 試驗報告。
5. 王燭辰、張政宏、林本欽，1986：Serological Survey on Bovine Leukemia Virus Infection in Taiwan. J. Chinese Soc. Vet. Sci., 12:7-14.
6. 小山弘之、寶達勉、梶川治、椿志郎、吉川博康、吉川堯、齊藤博，1981：寒天グル内免疫擴散法に用する牛白血病ウイルス抗原の最適力價にツツこ。日獸會誌，34：374-378。
7. 大島寬一、池田卓也、沼宮内茂、岡田

- 幸助、萱野裕是、1983：牛群の牛白血病ウイルス抗體保存狀況の推移に関する研究、日獣會誌、36：130-134。
8. Chung, Y.S., H.C. Prior, P.F. Duffy, R.J. Rogers and A.R. Mankenzie 1986. The effect of pasteurisation on bovine leucosis virus-infected milk. *Australian Vet. Jour.* 63 (11) 379-380.
 9. Darlington R.L., R.F. Digiacomo and J.F. Evermann. 1984. Bovine leukemia virus transmission by dehorning in dairy heifers. *Bovine Practitioner* 19:144-146. *Vet. Bulletin.* 1986 (56) 2:122,1045.
 10. Evermann J.F., Digiacomo, R.F., Ferrer and S. M. Parish. 1986. Transmission of bovine leucosis virus by blood inoculation. *A.J.V.R.* 47(9) 1885-1887.
 11. Henry, E.T., J.F. Devine and L. Coggins. 1987. Rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle and sheep. *A.J.V.R.* 48 (4) 634-636.
 12. Honma, T.M. Onuma, T. Mikami and H. Izawa, 1980: Evaluation of Syncytium for Bovine Leukemia Virus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42:1-4.
 13. Itohara, S., I. Oikawa, S. Terui and Y. Mizuno. 1985. Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titres. *Jpn. Jour. of Vet. Science.* 47 (5) 807-810.
 14. Liebermann, H., W. Wittmann R. Riebe and E. Starick. 1985. Syncytial inhibition test for antibodies to bovine leucosis virus. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* 39 (5) 712-717. *Vet. Bulletin.* 1986 (56) 2:123,1051.
 15. Lucas M H., D. H. Roberts and G. Wibberley. 1985. Ear tattooing as a method of bovine leucosis virus infection. *British Vet. Jour.* 141 (6) 647-649. *Gareiss W., W. Wittmann, I. Rättig and H. Pitzschke.* 1985. Significance of calves born serologically positive in the control of bovine enzootic leucosis.
 16. Mammerrickx M., D. Portetelle, J. Nys and A. Burny. 1985. Rapid detection of bovine leukemia virus infection in a large cattle population with an ELISA performed on pooled sera grouped by herd. *Zentralblatt für Veterinärmedizin.* B 32 (8) 601-608. *Vet. Bulletin.* 1986 2:122,1049.
 17. Miller, J.M., L. D. Miller, C. Olson and K.C. Gillette. 1969: Virus like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to Bovine lymphosarcoma. *L. Natl. Cancer Inst.* 43: 1297-1305.
 18. Onuma, M., C. Olson, L.E. Baumgartener, and L.D. Pearspm. 1975: An Ethersensitive antigen associated with Bovine Leukemia Virus infection. *J. Nat. Cancer Inst* 55: 1155-1158.
 19. Onuma, M. Honma, T., and T. Mikami, 1978: Survey for Antibodies to Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle in Japan. *Jap. J. Vet. Sci.* 40:691-696.

Development of a diagnostic antigen and serological survey of bovine leukosis in Taiwan

Y.H. Yang, Y.S. Wu, J.R. Shiau, S.J. Lee, C.C. Huang, S.J. Liaw,
S.H. Lee, W.M. Chang and S.Y. Chiu.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Summary

Antigen for the diagnosis of bovine leukosis in immunodiffusion test was extracted from FLK cells which had been infected with bovine leukemia virus. Serological survey of serum sample obtained from cows in 19 geographical regions of Taiwan was made in 1987, 5466 out of 31581 were positive. The positive rates varied from 0% to 40.74% in different geographical regions with an average of 17.31%.

There were 9 regions in which the positive rates were higher than 20% suggesting that morbidity of the disease was increasing.

No evidence was demonstrated in any serum collected from buffalo and deer. However, 17 out of 2028 goat serum samples were detected positive.