

八十五年度本省豬瘟病例之監測

林榮培* 黎南榮 陳金蘭 潘居祥 鍾明華

台灣省家畜衛生試驗所豬瘟研究系

摘要 民國 84 年 7 月至 85 年 6 月間，本省野外可疑豬瘟病例 168 例，將其 5 倍病材乳劑，經以動物接種，血球吸附試驗，接種 PK-15 培養細胞分離病毒，豬瘟及豬假性狂犬病螢光標示抗體染色，電子顯微鏡檢查等檢測結果，其中 52 例為豬瘟感染，1 例為豬假性狂犬病，7 例為豬生殖與呼吸綜合症 (PRRS) 感染，無檢出非洲豬瘟病例。可疑豬瘟病例並以 RT-PCR 檢測其豬瘟核酸，結果二者均相符合。

關鍵詞：豬瘟，非洲豬瘟，監測

緒 言

豬瘟係本省豬隻重要疾病之一，歷年來一直影響養豬事業發展至鉅。由 Lin and Lee⁽¹⁸⁾ 在本所開發的 (LPC-China) 兔化疫苗，雖安全性極高且免疫效力優異，但其使用結果仍無法制止豬瘟的散發。其主要原因之一係受豬瘟移行抗體之干擾而未能充份發揮疫苗的效果。其餘如豬場免疫計畫之紊亂，衛生管理欠佳，人員車輛進出未加管制、消毒等均為其原因。

近年來國際間交通頻繁及動物與畜產品進出口大量增加，走私進口畜產品也時有發生，故外來惡性動物傳染病之侵入孔道與機會增多，如萬一發生將造成家畜禽嚴重死亡，損失之巨將嚴重影響畜牧生產事業及農牧產品之輸出，世界各國無不嚴加防範，並建立嚴密之診斷防疫體系，為保護本省畜產事業，外來惡性動物傳染病之及早發現與診斷，至為重要。

非洲豬瘟是一種傳染性極高的急性病毒性疾病，其特徵為急性敗血症，感染以及死亡率均可謂 100%，但常在地或慢性型則死亡率減低，其病徵則較不嚴重，卻很類似豬瘟，該病目前尚無有效的疫苗，萬一發生時必須全面撲殺與隔離^(1, 2)，為嚴防非洲豬瘟潛入本省，必須對可疑豬瘟之病例，同時進行非洲豬瘟之檢測。

非洲豬瘟之診斷，急性型可以臨床症狀及解剖病變略加以初步診斷，但須與豬丹毒及沙氏桿菌症類症鑑別，最終診斷應以試驗室檢驗做病毒分離或證明非洲豬瘟抗原之存在而確定之。如果需與豬瘟類症鑑別則以鑑定材料接種於已經豬瘟疫苗免疫過的豬，倘有明顯病變時，則可判定為非洲豬瘟。常在型或慢性型非洲豬瘟須進行實驗室之診斷，該病可以冷凍切片螢光標示抗體法檢出病毒，以及培養細胞分離病毒或證明抗體的存在，如間接免疫酵素法 (IIPS)、免疫滲透電泳法、間接螢光抗體法、瓊脂凝膠擴散沉澱法、間接酵素連結免疫吸附試驗等均可用於診斷該病，但本所目前並無非洲豬瘟之診斷試劑，故擬以動物接種，血球吸附試驗，接種培養細胞分離病毒，豬瘟螢光標示抗體染色及電子顯微鏡檢查等來檢測此外來惡性動物傳染病。

本篇為筆者 (林等) 於民國 84 年 7 月至 85 年 6 月對豬瘟與非洲豬瘟監視檢測工作之報告。

試驗材料與方法

一、蒐集病材：

民國 84 年 7 月至 85 年 6 月間，本省野外凡發生豬瘟或可疑豬瘟或懷疑為非洲豬瘟之病例均蒐集其病材，供試。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

二、動物接種：

選取已經豬瘟疫苗免疫及未免疫之中豬，將病材以 MEM 培養液添加 5 倍抗生素做成 5 倍乳劑，各接種 5 ml，觀察其發病情形。斃死豬或病重豬解剖檢查，採取血液及各臟器以備接種於白血球分離病毒。

三、白血球培養 (buffy coat culture)：

選取健康豬以 12 號採血針採血入脫纖瓶，以玻璃珠脫纖十分鐘，通過兩層紗布漏斗以去除玻璃珠和血液中纖維，脫纖血液加入抗生素 (盤尼西林 100 u/ml，鏈黴素 100 µg/ml)。室溫中以 800 g 離心 30 分鐘，抽取白血球一以注射筒和長針先抽取上層血清保留備用，再小心抽取白血球層，放入 15 ml 之透明離心管，加入前述保留備用之血清至全量 12 ml 後，上下抽動以沖散白血球。於 4 °C，800 g 離心 30 分鐘。小心抽取白血球層，放入保留備用之血清內，做成白血球懸浮液。分裝於 24 孔塑膠培養盤內，每孔 0.4 ml 或分裝於 48 孔培養盤內，每孔 0.2 ml。置於 37 °C，5 % CO₂ 之培養箱內培養供試驗用。

四、紅血球吸附試驗：

將 5 倍病材乳劑或發熱最高時之病豬血液、脾或淋巴節做成乳劑，接種於培養之白血球，觀察紅血球吸附於白血球之情形。

五、接種培養細胞：

將病材乳劑做 10 倍系列稀釋，接種於已形成單層細胞之 PK-15 株化細胞，增殖 4 天後，以豬瘟螢光標示抗體染色，觀察是否為豬瘟病例。

六、豬巨噬細胞培養與病材接種：

選取 2~6 週齡 SPF 小豬，放血，剖開胸腔，無菌操作夾住咽喉頭處氣管，取下心肺，以 150 ml 含 10 % 胎牛血清，500 u/ml 青黴素，500 µg/ml 鏈黴素之 MEM 灌洗肺臟，反覆灌洗 6 至 8 次。收集沖洗液，以雙層細濾網過濾。濾液以 4 °C、280 g 離心 15 分鐘，去上清，以 10 ml 細胞培養液懸浮沉澱之細胞，再以 4 °C、280 g 離心 15 分鐘，反復三次。最後以細胞培養液配成 2 × 10⁶ 個/ml 之細胞懸浮液，24 孔培養盤每孔加入 0.4 ml，接種病材乳劑 0.1 ml，置 37 °C，5 % CO₂ 培養箱內培養觀察。

七、電子顯微鏡檢查：

將病材乳劑以高速離心後經負染色，於電子顯微鏡下檢查病毒顆粒形狀。

八、聚合酶鏈反應試驗：

以聚合酶鏈反應 (PCR) 技術，檢測可疑豬瘟病材內豬瘟病毒核酸及探討 PCR 偵測的結果與病毒分離情形的相關性^(11,12)。

- (1) 病毒核酸之萃取：100 µl 之病材乳劑與 1,000 µl 之 Trizol 試劑混合後，加 200 µl 之氯仿萃取，4 °C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清，再經等量 Isopropanol 萃取一次。沉澱物加入 100 µl 之絕對酒精，於 12,000 rpm 離心 5 分鐘，真空乾燥 3 分鐘，加入 DEPC 處理之水 36.9 µl 即得。
- (2) 引動子：豬瘟引動子是由劉世東博士所設計提供者。
- (3) 反轉錄與聚合酶鏈反應：將萃取好之病材核酸，加入去氧核甘三磷酸、RNA 的抑制劑與 RNA 序列互補 3' 端的引動子、反轉錄酶 AMV、Taq DNA 聚合酶緩衝液、5' 端的引動子、Taq DNA 聚合酶，將全量加到 100 µl，以 thermal cycler 進行反轉錄及聚合酶鏈反應。其反應為經 42 °C 作用 40 分鐘反轉錄，接著為 denature 溫度 94 °C 維持 35 秒，然後降低到 45 °C 讓引動子與模板結合維持 70 秒，再將溫度提高到 72 °C 維持 70 秒、連續循環 30 次。最後再 72 °C 7 分鐘。
- (4) 膠體電泳分析：以 TBE 緩衝液配製 2 % agarose gel，用 10 µl 之聚合酶反應產物進行電泳分析。

結 果

84 年 7 月至 85 年 6 月合計蒐集可疑病例 168 例，將其 5 倍病材乳劑接種於培養之白血球，進行紅血球吸附試驗，結果均無紅血球吸附於白血球週圍之現象出現。

將病材乳劑以高速離心後經負染色，於電子顯微鏡下檢查病毒顆粒形狀。結果均未發現非洲豬瘟病毒顆粒之存在。

將病材乳劑做 10 倍系列稀釋，接種於已形成單層細胞之 PK-15 株化細胞，及 RK-13 細胞增殖後，以豬瘟螢光標示抗體及豬假性狂犬病螢光標示抗體染色，結果 168 例中有 52 例証明為豬瘟感染病例，1 例為豬假性狂犬病。

表 1 民國八十四年七月至八十五年六月各地區可疑豬瘟
非洲豬瘟病例鑑別診斷之結果

地 區	台 北 市	台 北 縣	桃 園 縣	苗 栗 縣	台 中 縣	南 投 縣	彰 化 縣	雲 林 縣	台 南 縣	高 雄 縣	屏 東 縣	宜 蘭 縣	花 蓮 縣	台 東 縣	澎 湖 縣	合 計
病材數	3	6	4	4	15	8	3	3	29	57	8	20	3	2	3	168
豬 瘟	3	3			8	2	3		6	11	3	8	2		3	52
豬假性 狂犬病	1															1
PRRS		2			1		1					3				7
非 洲 豬 瘟																0

將病材乳劑做 10 倍系列稀釋，接種於培養之豬巨噬細胞增殖後，以豬生殖與呼吸綜合症（porcine reproductive and respiratory syndrome 簡稱 PRRS）螢光標示抗體染色，結果 168 例中有 7 例証明為豬生殖與呼吸綜合症病例。詳如表一。

將病材乳劑接種於已經豬瘟疫苗免疫之中豬，結果均無任何症狀出現。

以豬瘟螢光標示抗體、豬假性狂犬病螢光標示抗體及豬生殖與呼吸綜合症螢光標示抗體染色，証明為豬瘟感染、豬假性狂犬病感染及豬生殖與呼吸綜合症感染之病例，以免疫膠體金負染色及 PTA 負染色，於電子顯微鏡下檢查病毒顆粒形狀。結果可各別檢出豬瘟病毒顆粒、豬假性狂犬病病毒顆粒及豬生殖與呼吸綜合症病毒顆粒。

將可疑豬瘟病材乳劑以豬瘟 RT-PCR 測試結果與螢光標示抗體染色結果一致。

由以上各種診斷方法直接及間接証明所蒐集之病例均非非洲豬瘟。

討 論

台灣的豬瘟於兔化豬瘟疫苗開發前，發生甚為嚴重，1947 年發生率曾高達 8.13%⁽¹⁸⁾，1958 年全面使用兔化豬瘟疫苗後漸漸降為 0.06%，1965 年再降至 0.02% 以下⁽¹⁸⁾，目前約在 0.02 至 0.08 之間⁽¹⁸⁾。本試驗中 168 例可疑病例有 52 例經證實為豬瘟，佔 30.98%，豬生殖與呼吸綜合症病

例有 7 例約 4.17%，還是以豬瘟佔最大多數。兔化豬瘟疫苗，安全性極高且免疫效力優異，但其使用結果仍無法制止豬瘟的散發，除移行抗體，帶毒豬之問題外⁽³⁾，個中原因將另文探討。

非洲豬瘟之診斷，急性型可以臨床症狀及解剖病變略加以初步診斷，最終診斷則應以試驗室檢驗做病毒分離或證明非洲豬瘟抗原或抗體之存在而確定之^(2, 10, 19)。其方法如下：1. 以病材乳劑接種經豬瘟疫苗免疫及未免疫之豬隻^(2, 10, 15, 19)。2. 血球吸附試驗^(9, 10, 13, 19) (Had)。3. 直接免疫螢光法^(8, 19) (FA)。4. 膠內沉降反應 (AGID)^(6, 19)。5. 補體結合試驗 (CF)^(10, 15)。6. 放射性免疫試驗 (RIA)^(5, 17)。7. 間接免疫螢光法 (IIF)^(8, 19)。8. 免疫電泳法 (IEOP)⁽¹⁷⁾。9. 酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA)⁽⁷⁾。10. 間接免疫過氧化酵素試驗 (IIPS)⁽¹⁶⁾。11. 電子顯微鏡負染色檢查⁽⁴⁾ 等方法。以上數種方法合併使用當可達到正確診斷之目的。Had 對非洲豬瘟病毒來說是非常特異的，如發現 Had 現象再加上解剖病變補助當可判定為非洲豬瘟^(9, 10, 13, 19)。本試驗先以 Had 檢查蒐集病材是否有吸附紅血球現象，同時以電子顯微鏡負染色檢查病材，結果血球吸附現象均為陰性且無類似非洲豬瘟病毒顆粒發現。此外，將 buffy coat 血球、病材冷凍切片及病材接種細胞進行螢光標示抗體染色，於 168 例病材中，有 52 例證明為豬瘟感染病例，1 例為豬假性狂犬病。值得注意的是其中有 7 例觀察到豬生殖

與呼吸綜合症病原，檢出率甚高。本實驗室目前尚無非洲豬瘟診斷試劑。因此，另進行豬隻接種試驗。除陽性豬瘟病材引起未經豬瘟疫苗免疫豬隻呈現典型之豬瘟症狀外，其餘豬隻均健存。利用動物接種，證明病材為豬瘟也可反証不是非洲豬瘟感染。綜合上述試驗結果顯示，受檢病材中並無非洲豬瘟之潛存。

誌謝 本試驗承呂蓮葉小姐、呂佳琪小姐之協助，楊喜金主任、陳清博士之指導，謹致萬分之謝忱。

參考文獻

1. 林再春。荷蘭發生與撲滅非洲豬瘟之始末。淡水鎮。台灣省家畜衛生試驗所印行。1988。
2. 林榮培。外來惡性家畜傳染病診斷手冊。南投。台灣省政府農林廳印行。1987。
3. 林榮培、黎南榮、林有良、林敬覆、黃天祥、楊揚輝。以聚合鏈反應技術檢測豬瘟帶毒豬。台灣省畜衛所研報 No. 31 : 5-11, 1995。
4. Breese, S. S., Deboer, C. J. Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* 28, 420-428. 1966.
5. Crowther, J. R., Wardley, R. C. and Wilkinson, P. J. Solidphase radioimmunoassay techniques for the detection of ASF antigen and antibody. *J. Hyg. Camb.* 83, 353. 1979.
6. Coggins, L. and Heuschele, W. P. Use of agar diffusion precipitation test in the diagnosis of african swine fever. *Amer. J. Vet. Res.* 27, 486. 1966.
7. Hamdy, F. M., Colgrove, G. S. Rodriguez, E. M., Snyder, M. L. and Stewart, W. C. (1981) Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to African swine fever virus. *Amer. J. Vet. Res.* 42, 1441.
8. Heuschele, W. P., Coggins, L. and Stone, S. S. Fluorescent antibody studies on African swine fever. *Amer. J. Vet. Res.* 27, 477, 1966.
9. Hess, W. R. and DeTray, D. E. The use of leukocyte culture for diagnosing African swine fever (ASF). *Bull. Epiz. Dis. afr.* 8, 317, 1960.
10. Hess W. R. African swine fever : A Reassessment. *Advance in veterinary science and comparative medicine.* Vol. 25, 39-69. 1981.
11. Henry A. Erlich, Richard Gibbs, Haig H. Kazazian, Jr. *Polymerase Chain Reaction.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
12. Gregor M., Tillmann R. and Heinz J. T. Molecular Cloning & Nucleotide Sequence of the Genome of Hog Cholera Virus. *Virology* 171 : 555-567. 1989.
13. Malmquist, W. A. and Hay, D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Amer. J. Vet. Res.* 24, 450. 1963.
14. Moulton, J. and Coggins, L. Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet.* 58, 364. 1968.
15. Montgomery, R. E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Path.*, 34, 159 and 243. 1921.
16. Pan, I. C., Hung, T. S. and Hess, W. R. New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever. *J. Clin. Microbil.* 16 : 650-655. 1982.
17. Pan, I. C., Deboer, C. J. and Hess, W. R. African swine fever : Application of immunoelectrophoresis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.* 36, 309. 1972.
18. Tracy T. C. Lin and Robert C. T. Lee. An overall report on the development of a highly safe and potent lapinized hog cholera virus strain for hog cholera virus strain for hog cholera control in Taiwan. *NSC Spec. Publ.* 5 : 1-44. 1981.
19. Yechiel Becher. *Development in veterinary virology : African swine fever.* Martinus Nijhoff Publishing, Boston. 1987.

Surveillance of Hog cholera and African swine fever in fiscal year 1995

Lin, Y. P.,* N. J. Li, J. L. Chen,
C. H. Pan and M. H. Jong

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

SUMMARY A total of 168 samples were collected from the field in fiscal year 1995 to survey the invasion of Hog cholera (HC) and African swine fever (ASF), the 1 : 5 emulsion of the samples were prepared and used for following studies, the procedure performed included : (1) inoculated in HC — immune pigs and susceptible controls (2) leucocyte cultures (3) inoculated PK — 15 cells for virus isolation (4) FA test for HC and pseudorabies detection (5) electron microscopic examinations and (6) RT — PCR tests.

The results indicated that no ASF infection could be detected from the tests. However there were 52 cases of HC infections. In addition, one pseudorabies case and 7 porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) cases were identified. The RT — PCR tests were conducted on the samples to double check for nucleic acid of HC, the results were consistent with those obtained from other tests.

Key words: *Hog cholera, African swine fever, Surveillance*

*Corresponding author

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