

臺灣 2005 年傳播性海綿狀腦病與狂犬病監測報告

李淑慧*、張國慧、蔡國榮、張仁杰、洪哲惇

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

2005 年共監測 571 例 24 月齡以上牛腦，其中 535 例係屠宰場逢機採樣檢體、2 例結核病撲殺牛隻、6 例加拿大進口追蹤列管臨床上呈衰弱或死亡牛隻、1 例疑似吞食異物致死病例、1 例查緝私宰牛隻、1 例下痢牛隻及 25 例高齡淘汰乳牛，檢驗結果牛海綿狀腦病皆為陰性。另監測 21 頭 24 月齡以上羊腦，檢體取自衰弱淘汰乳羊，檢驗結果傳播性海綿狀腦病為陰性。此外應用酵素連結免疫吸附法檢測 2,772 件犬隻血清中狂犬病抗體，其中家犬佔 1,304 件，陽性率為 57.1%，流浪犬佔 1,451 件，陽性率為 26.6%，顯示國內犬隻狂犬病預防注射率仍有提高之空間。另應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法及反轉錄聚合酶鏈反應，檢測 118 例犬腦組織，包括 2 例犬瘟熱病例、1 例疑似麻醉過量病例、23 例走私犬及 92 例流浪犬，結果皆未檢測出狂犬病抗原及特徵性病變。綜合前述監測結果，台灣至今仍為傳播性海綿狀腦病及狂犬病之非疫區。

關鍵字：傳播性海綿狀腦病、狂犬病、監測

緒言

傳播性海綿狀腦病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)係造成感染動物的腦組織出現類似海綿狀變性病變的疾病，又稱普里昂疾病(prion disease)，這類疾病包括人的庫賈氏症(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、牛海綿狀腦病(bovine spongiform encephalopathy, BSE,俗稱狂牛病)、搔癢症、傳播性貂腦病、鹿與麋鹿的慢性消耗病(或狂鹿症)以及貓科動物海綿狀腦病。各種傳播性海綿狀腦病的致病機序並不完全相同，真正的致病原因目前尚未完全清楚，目前認定致病原為「變性普里昂蛋白質」[20]，會在患病動物或人類腦組織不正常聚集，造成腦組織病變，由於致病過程相當緩慢，所以一般需要經過數年的潛伏期才會發病。1986 年 BSE 首先於英國被發現，目前歐洲大多數的國家、日本、加拿大及美國等陸續發現本病而成為疫區。BSE 的發生除對畜牧產業帶來衝擊外，嚴重影響動物

及畜產品出口貿易，1996 年發現的人類新變異型庫賈氏症(new variant CJD)更被認為可能和曾經食入感染牛海綿狀腦病的牛製品有關[7,11]，其在人畜共通傳染病防治上的重要性，不言可喻。

狂犬病是古老且重要的人畜共通的疾病，幾乎所有溫血動物都可感染，主要經咬傷後自傷口感染，病毒進入體內經過長短不一的潛伏期後，最後到達中樞神經，引起嚴重的神經傷害，繼而造成肌肉麻痺、昏迷和死亡。本病病原為桿狀病毒科(Rhabdoviridae)之 Lyssavirus 病毒屬。病毒顆粒大小為 75 ×180 nm，形如孢彈狀，具外膜，病毒核酸屬於線狀單股 RNA 病毒。犬隻的潛伏期平均為 3 至 8 週，發病後約 5 至 7 天死亡，臨床症狀可分為前驅期、狂躁期及麻痺期；人類主要經由帶毒動物或家畜咬傷而感染，發病時會有焦慮、頭痛、發燒、咬傷部位有異樣感，然後會出現麻痺及飲水時有吞嚥困難的現象，見到水即誘發咽喉部肌肉之痙攣，即所謂恐水現象，且

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

併有精神錯亂及抽搐之情形，最後因呼吸麻痺而導致死亡。本病為古老之疾病，幾乎分佈於全世界。台灣早年亦有本病發生，經各方努力後目前為亞洲地區極少數非疫區國家之一。據 2001 年世界衛生組織的資料，估計全世界每年約有四萬至七萬人死於本病，以亞洲及非洲國家發生較多[26]。

材料及方法

傳播性海綿狀腦病之診斷及監測

病材來源：為達成世界動物衛生組織之非疫區認定條件[19]，本所自 1998 年 7 月 1 日開始進行牛海綿狀腦病之持續性監測工作，採樣對象為 24 月齡以上出現之神經症狀病死牛隻、屠宰場或化製場逢機採樣、結核病陽性撲殺牧場每場次採樣一頭及其他原因送檢至本所檢驗之病例[4]。採取之牛腦以腦幹為重點部位，用刀從中線對稱地將腦切割成兩半，其中一半牛腦冷凍保存於 -20°C ；另一半的牛腦置於 10 %中性福馬林液固定液。本年度持續將 24 月齡以上高齡淘汰山羊納入監測對象。

監測方法：BSE 的診斷以組織病理學為主，並至少應配合免疫組織化學染色法或西方免疫墨點法或酵素連結免疫吸附分析法等其中一種檢驗方能確診[18]。福馬林固定腦組織以組織病理學診斷方法進行檢驗；冷凍部份以西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法進行篩檢。組織病理切片若觀察到懷疑之病變或西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法出現疑陽性結果時，則再以免疫組織化學染色法確診之[3,4]。

組織病理學診斷：將採集的腦組織置於 10 %中性福馬林液固定完全後，取大腦、小腦及腦幹共 10 個部位的腦組織，其重點部位為延腦 (medulla oblongata) 成“V”字形尖端的門 (obex)，[18]修整成約 4 mm 的厚度，放入脫水包埋盒中，再浸泡於 98%的蟻酸中 1 小時 (將具感染能力的 prion 不活化)，取出浸泡於 10%中性福馬林液中 2 天。再依一般例行之病理切片方法，經組織塊脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成 3-5 μm 厚之切片，脫蠟後經 H & E 染色

及封片，於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片中的病理變化[25]。

免疫組織化學染色法：利用對 prion 蛋白質特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測腦組織中的 PrP^{Sc}[9, 18]。仿照組織病理學診斷之切片製作步驟製作組織切片，其中切片厚度調整為 10 μm ，每次染色需同時染陽性對照 (來源：分讓自美國肯德基州立大學之羊搔癢症病例切片)。組織切片如常規進行脫蠟後，以磷酸鹽緩衝液 (0.1 M phosphate buffer solution, pH 7.2, PBS) 洗 3 次，每次 5 分鐘，置於蛋白酶 K 溶液 (1 M Tris/HCl, pH8.0, 2.5 mL + 0.1 M CaCl_2 , 0.75 mL + 14.7 mg/mL proteinase K 17 μL ，distilled water add to 50 mL) 中 37°C 15 分鐘。將切片放入不銹鋼盒中加入沸水，置於 1bar 121°C 高溫高壓滅菌器中 20 分鐘後，再以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，然後置於甲醇-雙氧水溶液 (30% H_2O_2 1.5 mL + 50 mL methanol) 中 5 分鐘以去除內源性過氧化酶，再以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。取出切片，組織周圍以無塵拭紙吸乾水分，置於保溼盤中，在組織上滴滿 5%的正常豬血清 (約 200 μL)，於室溫 20 分鐘，倒掉血清。在組織上滴滿 PrP 單株抗體 (1:1000 F99/97.6.1 anti-PrP monoclonal antibody, VMRD Inc.)，置於 37°C 4 小時或隔夜，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。在組織上滴滿次級抗體 (biotinylated secondary antibody, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 10 分鐘，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，在組織上滴滿受質 (peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate Detection Kits)，置於室溫 10 分鐘。以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，再用蒸餾水洗去鹽類，在組織上滴滿 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 呈色劑或 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 呈色劑 (substrate, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 5 分鐘，用蒸餾水洗。滴上蘇木精複染數秒，然後水洗，封片，置於顯微鏡下鏡檢。

西方免疫墨點法 (Western immunoblot method)：採用商品化檢測套組 (Prionics®-Check,

Roche Applied Science)，其原理主要是偵測腦組織中對蛋白酶 K (proteinase K) 有抵抗性的 PrPSc，因為正常的 prion 蛋白質會被蛋白酶 K 所消化，而不正常的 PrPSc 對蛋白酶 K 具有抗性，只被部分消化，所以分子量會由 32-35kD 變為 27-30 kD[8,17,18,22]。選取延腦的門 (obex) 或腦幹或大腦灰質部的腦組織(約 0.5g)，加入 10 倍體積均質溶液(homogenization working solution)磨成均質乳劑，取 100μL 乳劑加 10μL 消化緩衝液及 10μL 蛋白酶 K 混合均勻後置於 50°C 加熱 40 分鐘，然後加 10μL 消化停止液以終止反應。再加入 100μL PAGE 樣本緩衝液混合均勻，加熱至 96°C 5 分鐘。架設電泳膠片，加入電泳緩衝液於電泳槽內。取待測樣本、對照樣本各 10(L 分別加於電泳膠片孔內以 200 伏特電泳 30-45 分鐘。電泳膠片取出以濕式轉漬器來進行轉漬 (transfer) 至 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上，於 4°C 150 伏特 1 小時。然後取出膜以 Ponceau S 染色 2 分鐘，標示標記分子的大小，然後以 TBST (tris-buffered-saline with tween-20) 脫色。以 PVDF 阻斷緩衝液於室溫震盪 0.5-1 小時，以 1:5000 倍稀釋的單株抗體，置於震盪器上於室溫反應 1-2 小時，然後以 TBST 洗 4 次，再以 1:5000 倍稀釋的次級抗體，置於震盪器上於室溫反應 0.5-1 小時，以 TBST 洗 4 次。將 PVDF 膜浸泡於 Luminescence 緩衝液中震盪 5 分鐘，再加入 50(L CDP-Star 於室溫 5 分鐘，然後將膜上的水分吸乾，置於透明保護膜內於暗房中放入 X 光底片上壓片，再沖洗底片觀察結果。

酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)：採用商品化檢測套組 (Pronics®-Check LIA kit, Roche Applied Science)，乳劑之製備方法同前，檢測步驟略述如下。取出 digestion plate，加入 100μL 乳劑及 50μL 消化溶液 (3 mL homogenization working solution + 1 mL digestion buffer + 1 mL proteinase K 可供一盤檢驗) 混合均勻，用膠膜封盤，置於 47°C 60 分鐘，加 10μL digestion stop 中止消化反應。取出 preincubation plate，於前三排加入 30μL 陽性對

照、陰性對照，其餘孔內加入 15μL 乳劑與 15μL assay buffer，每孔再加入 10μL preincubation buffer，感作二分鐘，加入 200μL detection antibody solution (25 mL dilution solution + 10μL antibody solution 可供一盤檢驗)用膠膜封盤，於 500 rpm 搖晃感作 60 分鐘，再以八爪微量分注器移入 capture plate，於 500 rpm 搖晃感作 90 分鐘。以 washing solution 清洗四次，拍乾後加 100μL chemiluminescent substrate working solution (5 mL chemiluminescent substrateA + 5 mL chemiluminescent substrateB 可供一盤檢驗)，將 capture plate 置入冷光儀 (chemiluminescence ELISA plate reader)，靜置 5 分鐘後讀取結果。

狂犬病監測與疫苗抗體調查

病例來源及監測方法：抗體監測：定期收集北、中、南、東及金門等地家犬及流浪犬之血清，應用酵素連結免疫吸附法檢測血清中之狂犬病抗體陽性率，以了解台灣犬隻抵抗狂犬病病毒入侵之能力。抗原監測：檢測臨床上出現神經症狀、曾咬人或是疑似狂犬病病例，並定期採集北、中、南、東流浪犬收容中心流浪犬之腦組織，應用直接免疫螢光標示抗體檢查法、組織病理學診斷法及反轉錄聚合酶鏈反應檢測狂犬病病變及抗原。

監測方法：在狂犬病的多種診斷方法中，以直接免疫螢光標示抗體檢查法為世界各診斷實驗室公認最為敏感、快速且特異性高的方法，其敏感性比接種小白鼠分離病毒高，故送檢之疑似病例或例行性監測犬腦除以組織病理學檢查病理變化外，皆需以直接免疫螢光標示抗體檢查，結果若為疑陽性時需再以反轉錄聚合酶鏈反應、老鼠神經胚胎株化細胞或實驗動物接種分離狂犬病病毒以進行確診[1,15,24]。茲將實驗室診斷與監測方法詳述如後：

直接免疫螢光標示抗體檢查法 (direct immunofluorescent test)：本法需先將感染動物的腦組織作成捺壓片，各取一小塊 (約 0.5 cm³) 大腦皮質、延髓、小腦及海馬角 (又稱 Ammon's horn)、橋腦、丘腦六個部位組織，分別以無菌竹棒

攪碎成團塊狀，將各個圓形組織團塊分別捺壓於載玻片上，再置於擦手紙上壓一下來除去多餘組織，以避免組織捺壓片太厚。完成的捺壓片自然風乾約 30 分鐘。以 -20°C 丙酮 (Merck®) 固定 10 分鐘 (固定反應不僅可將組織黏附於玻片上，並可同時改變細胞膜的化學特性，利於螢光抗體穿透細胞膜與狂犬病毒之核蛋白抗原作用)，再自然風乾。每次染色需同時染陽性對照與陰性對照。將捺壓片置於濕式染色盤內，於組織上滴滿狂犬病螢光標示抗體 (CENTOCOR® FITC anti-rabies monoclonal globulin) 以進行染色，置於 37°C 恆溫箱中感作 30 分鐘。捺壓片以磷酸鹽緩衝溶液 (0.01M PBS, pH8.5) 洗滌 3 次，每次 10 分鐘。最後以二次蒸餾水洗滌一次，洗去殘留鹽類。取出捺壓片去除多餘水份後，滴上適量 PBS-甘油封片液 (buffered glycerol mounting medium)，蓋上蓋玻片，置於螢光顯微鏡下觀察。

組織病理學診斷：以傳統的組織病理診斷方法將腦組織製作成石蠟包埋組織切片，經 H&E 染色於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片中的病理變化來診斷狂犬病，並以特殊染色 Mann's method 來染腦神經元細胞質內狂犬病特異性之病毒包涵體－奈格利小體 (Negri bodies)。

腦組織切片之製作：取出一半腦組織固定於 10% 中性福馬林液中 24 至 48 小時 (為求固定良好，組織之厚度以不超過 1 公分為原則)。取大腦、小腦及腦幹共六個部位的腦組織，其重點部位為海馬角，修整成約 4 mm 的厚度，放入脫水包埋盒中。依一般例行之病理切片方法，將組織塊脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成 3-5 μm 厚之切片。脫蠟後以 H&E 染色於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片的病理變化。

奈格利小體之染色 (Mann's method)：組織切片如常規進行脫蠟後，於室溫下置於甲基藍染色液 (1% 甲基藍溶液 18 mL + 1% 伊紅溶液 23 mL + 49 mL 蒸餾水，使用前才配製) 中 24 小時。取出切片水洗再置於 1.5% 氫氧化鈉酒精溶液 (1.5% NaOH in ethanol 1 mL + absolute ethanol 30 mL) 10 分鐘，使切片染成粉紅色判讀之。

反轉錄聚合酶鏈反應：利用反轉錄聚合酶鏈反應，增幅檢體中特異的狂犬病病毒核蛋白基因片段來檢測病毒核酸，適合實驗室快速診斷狂犬病之用。取約 0.2 克重約米粒大的腦組織置入微量離心管內，以組織研磨棒將組織搗碎，加入 1 mL RNA 純化試劑 (TRIzol, Invitrogen®)，震盪數秒鐘。加入 200 μL 氯仿 (chloroform, Merck®) 振盪 20 秒，以 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘。收集上清液至另一離心管，加入等量異丙醇 (isopropanol, Merck®)，室溫感作 10 分鐘。以 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，保留核酸沉澱物。加入 1 mL 75% 酒精 12,000 rpm 離心 5 分鐘，棄上清液去殘留離子，加入 100 μL DEPC-H₂O 溶解病毒 RNA，即可進行反轉錄聚合酶鏈反應。取一 0.2 mL PCR 專用薄壁離心管加入：DEPC-H₂O 32.5 μL 、檢體 RNA 5 μL 、10x Prozyme Buffer (Protech) 5 μL 、dNTP (1.25 mM, Invitrogen®) 4 μL 、AMV Reverse transcriptase (Promega) 0.5 μL 、正向引子 1013F (5' -GTAGGATGCTATATGGG-3') 1 μL 、反向引子 1426R (5' -TTCTTATGAGTCACTCGAATATGTCTTGT TTAG-3') 1 μL 、Rnasin (Promega) 0.5 μL 、Prozyme (Protech) 0.5 μL 。置入循環加熱器上 (Perkin Elmer 9600) 設定時間溫度如下： 40°C ，40 分鐘； 95°C ，2 分鐘；接下來 94°C ，30 秒； 45°C ，30 秒； 72°C ，30 秒做 35 個循環，再做 72°C ，7 分鐘。增幅的產物及 100 bp DNA Marker 分別與 6x dye 混合後，放入 2% 電泳膠片，在裝 TAE 緩衝液之水平式電泳槽內，以 100 伏特電壓進行電泳。電泳完成後，將膠片置於電泳膠片照相系統觀察。

老鼠神經胚胎株化細胞分離狂犬病病毒：老鼠神經胚胎株化細胞 (neuroblastoma cells) 可用來分離狂犬病病毒，比 BHK 細胞株敏感，不過不同的狂犬病分離株對此細胞的感受性並不相同。病材乳劑接種細胞株後，24 個小時即可直接以免疫螢光染色觀察。本實驗與小白鼠接種試驗敏感性相當，可取而代之，不僅便宜而且費時較短。

細胞繼代：將生長良好且無污染之老鼠神經胚胎細胞

(MNA) 25 cm² 角瓶一只，抽棄培養液後，以 1× PBS [Ca(-),Mg(-)] 5 mL 清洗細胞二次。加注 2 mL 消化液，置於 37℃ 消化約 2 分鐘。抽棄消化液後，加入 5 mL 細胞培養液並用滴管將細胞沖散成懸浮液。取 0.1 mL 上述細胞懸浮液加入 0.9 mL 0.4% trypan blue 染劑。以細胞計數盤計算細胞數。加入適量細胞培養液，將細胞濃度調整為 4 × 10⁶ 個/mL。
病材乳劑製作：將約 0.2 克重米粒大的腦組織置入微量離心管內，以組織研磨棒搗碎後加入 1 mL 細胞培養液，製成 20% 乳劑。置入抗霧氣離心座，以 1,600 rpm 離心 10 分鐘，收集其上清液。

病材接種與感作：取 0.5 mL 乳劑上清液置於 12 × 75 mm 無菌試管，加入 2 mL 濃度 4 × 10⁶ 個/mL 細胞懸浮液，震盪混合數秒。置於 37℃ 濕式恆溫箱內感作 30 分鐘，每 15 分鐘搖動混合一次。每個病材與細胞感作後加入 12.5 mL 細胞培養液，分裝成 1 個 25 cm² 角瓶和製作 12 片四孔經鐵氟龍被覆處理的玻片，每孔加入 0.2 mL。不鏽鋼淺盤上，鋪上浸濕的擦手紙並壓平將玻片置於其上，96 孔盤的上蓋以 70% isopropanol alcohol 噴灑消毒十分鐘後以紙巾擦乾，做為蓋子蓋住玻片。將角瓶和不鏽鋼淺盤置於 37℃ 濕式恆溫箱內。25 cm² 角瓶棄上清後，以消化液消化細胞，最後將細胞濃度調整為 5 × 10⁵ 個/mL，如步驟將細胞培養分裝成 1 個 25 cm² 角瓶和製作 12 片四孔經鐵氟龍被覆處理的玻片，置於 37℃ 濕式恆溫箱內培養，並以直接免疫螢光標示抗體檢查判定是否含有狂犬病病毒。

酵素連結免疫吸附法檢測血清抗體 (ELISA)：本試驗利用市售商品化酵素連結免疫吸附法檢測套組 (Platelia Rabies kit, 法國 Diagnostics Pasteur 生產) 來篩檢犬血清或血漿中是否存有對狂犬病病毒抗原的 IgG 抗體，其原理是使用被覆狂犬病病毒糖蛋白在 96 孔檢測盤中，加入的犬血清或血漿中若存有抗體，則抗原與抗體可結合並藉由與結合物 (conjugate) 的連結及酵素活化受質 (substrate) 來呈色，測定抗體的濃度。但以此方法並無法鑑別抗體來源自感染或是來自於疫苗免疫所產生的抗體。待測血清或血漿置於水浴槽內，以 56℃ 30 分鐘非慟

化，取出 96 孔抗原盤，置於室溫中回溫，將待測血清進行 100 倍稀釋並將陽性與陰性對照品進行系列稀釋 (取一新的 96 孔盤稀釋盤，加入 150 μL 樣品稀釋液至 B1~H1、B2~H2、B3~H3 微量孔中，其餘各孔則加入 297 μL 樣品稀釋液。將 3 μL 的待測血清由 A4、B4 起依序加至 G12、H12 已有稀釋液之微量孔中，在 A3 微量孔加 3 μL 陰性對照品，在 A1、A2 微量孔加 3 μL 陽性對照品。陽性對照二重複稀釋 100 倍後進行 2 倍序列稀釋，陰性對照稀釋 100 倍後進行 2 倍系列稀釋：由 A1、A2、A3 孔各取 150 μL 至 B1、B2、B3 孔，混合均勻後取 150 μL 至 C1、C2、C3 孔，如此依序操作至 H1、H2、H3 後完成)。打開 96 孔抗原盤包裝，取出所需數目 strips。每孔加入 300 μL 清洗液，然後甩掉盤內清洗液，倒置於毛巾或吸水紙上拍乾，如此重覆清洗二次。以八爪微量分注器將 96 孔稀釋盤內的稀釋檢體與系列稀釋陽性、陰性對照各取 100 μL 至相對位置之 96 孔抗原盤內，以封盤膜密封，置於 40℃ 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤，甩掉盤內液體，以清洗液清洗三次。配製結合物溶液 (1.1 mL 濃縮液加入 9.9 mL 清洗液，可供一盤試驗)，每孔加入 100 μL 結合物溶液 (conjugate)，以新的封盤膜密封，置於 40℃ 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤，甩掉盤內液體，以清洗液重覆清洗四次。配製受質溶液 (20 mL 受質緩衝液加入 2 顆呈色藥錠，可供一盤試驗)，每孔加入 100 μL 受質溶液，置於室溫暗室下感作 30 分鐘，加入 50 μL 停止液終止反應。30 分鐘內判讀：呈現黃色判為陽性，或以 ELISA reader 讀取波長 492nm 之吸光值。將系列稀釋陽性對照之吸光值與其抗體於 X-Y 座標軸上作圖求取抗體力價與吸光值之關係曲線，利用此關係曲線由檢測樣品之吸光值找出對應抗體力價，力價以 U.E. (unit equivalent to the international units) 表示，若力價大於 0.5 U.E./mL，判為陽性。

免疫組織化學染色：組織切片先以 xylene 浸泡 15 分鐘脫蠟，然後依序於 100% 酒精、90% 酒精、80% 酒精浸泡 2 分鐘；以二次水浸洗切片 2 次後，將切片置於 95℃ 之 PBS 中 20 分鐘，而後再將切

片置於室溫下的 PBS 溶液中，取出切片稍瀝乾後，覆蓋 100 μ L 的一級抗體（稀釋適當之倍數於 PBS 內），蓋上蓋玻片後置於 4℃，作用 8-12 小時。以 Tween-PBS (0.1% 之 Tween 20 於 PBS 中) (Roche, Germany) 浸洗，滴上標定螢光或其他呈色系統所用酵素的次級抗體，於室溫下作用 1 小時後，以 PBS-甘油 (Glycerol:PBS=1:1) (Sigma, Germany) 封片後於螢光顯微鏡觀察(波長 450-480 nm) (若使用螢光標定之次級抗體者)。

結果

牛海綿狀腦病之診斷及監測：今年共監測 571 頭 24 月齡以上牛腦，檢體採樣來源及各月件數如表 1 所示，來源包括 535 頭自屠宰場逢機採樣檢體 (522 件來自桃園縣屠宰場、13 件金門縣)，2 頭結核病撲殺牛隻 (金門縣 1 場及桃園縣各 1 場，每場次各 1 頭)，6 頭加拿大進口追蹤列管牛隻，1 頭查緝私宰牛隻，1 頭下痢病例，1 頭疑似吞食異物致死病例，25 頭高齡衰弱淘汰乳牛，各縣市送檢件數如表 2 所示，檢體皆無牛海綿狀腦病特異病變且未發現異常之普里昂蛋白質，檢驗結果皆為 BSE 陰性，至今台灣仍為牛海綿狀腦病之非疫區。

羊動物傳播性海綿狀腦病之監測：今年共監測 21 頭 24 月齡以上羊腦，檢體取自衰弱淘汰山羊，經檢驗皆無傳播性海綿狀腦病特異病變且未發現異常之普里昂蛋白質，檢驗結果皆為陰性。

狂犬病監測及狂犬病疫苗調查：今年共檢測 2,772 件血清之狂犬病抗體，陽性率為 40.8 % (1,132/2,772)；其中家犬計 1,304 件，血清抗體陽性率為 57.1 % (745/1,304)；流浪犬計 1,451 件，血清抗體陽性率為 26.6 % (386/1,451)；另有委託檢測之走私犬 17 件，檢測成績詳如表 3 所示。各縣市送檢成績如表 4 所示，送檢縣市包括：台北市、台中市、南投縣、台南市、高雄市、花蓮縣、台東縣、金門縣及澎湖縣共九縣市，家犬血清抗體陽性率介於 22.8% ~79.3 %，流浪犬血清抗體陽性率介於 15.3% ~42.1 %。此

外，在犬腦病原監測方面，送檢流浪犬犬腦包括台北市 21 件、台北縣 1 件、新竹縣 11 件、台中市 6 件、台南市 12 件、高雄市 14 件、台東縣 12 件與金門縣 15 件，共 92 件；桃園縣及台中市送檢犬瘟熱疑似病例各 1 件，台北市送檢疑似麻醉過量病例 1 件。另有委託檢測之走私犬 23 件，包括金門縣 2 件、澎湖縣 1 件及動植物防疫檢疫局 20 件，狂犬病犬腦抗原監測件數如表 6 所示，應用直接免疫螢光標示抗體檢查法、組織病理學診斷法及反轉錄聚合酶鏈反應檢測狂犬病病變及病毒抗原，結果皆為陰性，迄今我國仍為狂犬病之非疫區。

討論

目前 TSE 或 prion 疾病診斷以變性普里昂蛋白 (PrP^{Sc}) 為依據，除了羊搔癢症能採取眼瞬膜及扁桃腺進行活體診斷外，其他種類疾病僅能於動物死後應用免疫化學方式偵測之[18]，雖然後續仍有許多檢驗技術與套組被開發出來，但大多仍處於研究階段未能普遍地被應用於診斷。例如使用基因轉殖鼠 (transgenic mice) 來進行人工動物接種試驗，可大幅縮短原先接種小白鼠所需的 292 天潛伏期[6]。但因實驗動物的飼養較費人力，且需在符合生物安全三級的陰壓動物舍飼養，所以目前仍只應用於研究領域。另外在腦脊髓液或血液的檢驗方面，由 BSE 的確診病例發現可偵測出 apolipoprotein E、14-3-3、S-100 等蛋白質，但缺乏特異性尚無法應用於臨床診斷[10,12,21]。另有學者藉由電子化學分析法 (electrochemical analysis) 偵測感染 prion 動物尿液中的代謝物，但是這種方法的敏感性和特異性較低，目前仍不建議用作單一的診斷法[23]。此外由於新的檢驗方法缺乏真實之黃金診斷標準 (true gold standard)，且會隨著潛伏期的不同對前述檢驗方法的敏感性也有所不同，故仍需再評估其診斷實用性。根據世界動物衛生組織的建議，在發生率低的地區或是非疫區的監控仍是以組織病理學診斷與免疫組織化學染色為主[18]。

我國牛隻在養頭數約 150,000 頭，因臨床上

鮮少有兩歲齡以上牛隻有神經症狀之病例，故本研究自牧場收購衰弱淘汰牛隻與山羊供作監測，但 OIE 於今年 10 月修改牛海綿狀腦病監測規定為積分制，新制度著重於臨床上疑似病例與神經症狀病例收集，故下年度將設法增加收集臨床上神經症狀牛隻病例，以累積較高監測積分供非疫區申請。建請防疫主管機關加強 30 月齡以上臨床呈現神經症狀、倒臥無法站立、衰弱病死或瀕死牛隻之通報，將其納入監測計畫內，方能獲得較高之點數。

日本於 2001 年 9 月開始發現亞洲地區首宗 BSE 病例，至今年為止已有 21 個病例。根據英國非官方的報告（海關出口統計資料），指出英國曾在 1989 至 1996 年間輸入台灣 4,598 噸的飼料，其中可能包括肉骨粉，而且目前全世界已有二十四個國家（地區）為 BSE 疫區，所以為防範 BSE 入侵我國，我國應落實並加強各種相關防範措施，尤其是加強檢疫措施、防範走私、加強監測工作之執行、加強反芻獸飼料之使用管制及其宣導等。

狂犬病監測：本所自 1998 年開始進行犬隻狂犬病血清抗體調查，各年之血清抗體檢測結果詳如表 5，1998-2005 年共檢測家犬 10,557 隻，血清抗體陽性率平均為 55.2%，各年之家犬抗體陽性率分別 64.0%、57.6%、48.7%、49.9%、40.8%、61.3%、58.6%、57.1%；1998-2005 年共檢測流浪犬 11,734 隻，血清抗體陽性率平均為 31.7%，各年之流浪犬抗體陽性率分別 18.6%、46.6%、35.5%、21.7%、20.7%、41.1%、35.9%、26.6%，可見狂犬病疫苗抗體陽性率並不高，顯示國內犬隻狂犬病預防注射率仍有提高之空間。

狂犬病病毒抗原偵測：針對疑似病犬及流浪犬，至今共檢測 387 例犬腦組織，詳如表 7，結果皆為陰性。狂犬病病毒可感染大部份溫血動物，自然界亦有多種感受性動物分佈在歐、美、非洲等各地區，造成狂犬病的發生與流行，據世界衛生組織的資料，在非、亞、南美與中東等地，犬隻仍是主要傳播動物，而亞洲及非洲多數國家其境內犬隻狂犬病疫苗施打率不高(30%至 50%)，無法切斷疾病傳播[26]。

目前臺灣為狂犬病非疫區，但鄰近的國家除日本之外均為疫區，且近年來國際交通往來密切，非法走私動物及其產品之行為頻繁防不勝防。此外，我國與中國大陸兩岸開放小三通之後，交通更是日趨頻繁，使狂犬病入侵我國之風險大為提高，根據世界衛生組織之資料，大陸地區每年均有數百人死於狂犬病，近五年狂犬病感染人數持續上升，2004 年通報狂犬病病例達 2,660 人，因此防範狂犬病入侵的工作應積極地進行。應藉由宣導與教育強化全民對此疾病之認識，呼籲其定期對自己飼養之家犬注射狂犬病疫苗，嚴格控管流浪狗且減少其族群之擴張。使 80% 以上畜犬具有抵抗狂犬病病毒感染之能力，如此方能免於狂犬病入侵之威脅。

表 1. 2005 年牛海綿狀腦病監測檢體採樣來源

來 源	月 份				合 計
	1-3 月	4-6 月	7-9 月	10-12 月	
屠宰場	252	159	104	20	535
結核病撲殺場	0	1	1	0	2
查緝私宰	0	0	0	1	1
送檢病例	2 ^a	6 ^b	5 ^c	20 ^d	33
合 計	254	166	110	41	571

備註：

a: 包括疑似吞食異物致死病例 1 例及加拿大進口衰弱追蹤列管牛隻 1 例(肺炎及腎炎病例)

b: 包括高齡衰弱淘汰乳牛 1 例及加拿大進口衰弱追蹤列管牛隻 5 例(難產病例 1 例、結核菌素檢驗陽性牛隻 4 例)

c: 包括下痢牛隻 1 例及高齡衰弱淘汰乳牛 4 例

d: 高齡衰弱淘汰乳牛 20 例

表 2. 2005 年牛海綿狀腦病監測檢體採樣之地區

區 別	縣 市	牛腦件數
北 區	台 北 縣	2
	桃 園 縣	525
	苗 栗 縣	7
中 區	彰 化 縣	3
	嘉 義 縣	2
	雲 林 縣	11
南 區	屏 東 縣	3
	台 南 縣	4
離 島	金 門 縣	14
合 計		571

表 3. 2005 年犬隻狂犬病血清抗體檢測數與陽性率

犬 別 \ 數 量	陽 性 數	檢 測 數	陽 性 率
家 犬	745	1,304	57.1%
流 浪 犬	386	1,451	26.6%
走 私 犬	1	17	5.9%
合 計	1,132	2,772	40.8%

表 4. 2005 年各縣市犬隻狂犬病血清抗體檢測數與陽性率

縣市別	家 犬		流 浪 犬	
	陽性數/檢測數	陽性率	陽性數/檢測數	陽性率
台北市	134/228	58.8%	52/208	25.0%
台中市	122/197	61.9%	78/212	36.8%
南投縣	76/152	50%	0	0
花蓮縣	0/2	0	0	0
台南市	192/242	79.3%	102/242	42.1%
高雄市	116/241	48.1%	42/275	15.3%
台東縣	21/92	22.8%	50/244	20.5%
金門縣	84/150	56.0%	62/270	23.0%
合 計	745/1,304	57.1%	386/1,451	26.6%

表 5. 1998-2005 年犬隻狂犬病血清抗體檢測數與陽性率

年度	家 犬		流 浪 犬	
	陽性數/檢測數	陽性率	陽性數/檢測數	陽性率
1998	1,167/1,823	64.0%	30/161	18.6%
1999	625/1,085	57.6%	585/1,256	46.6%
2000	266/546	48.7%	386/1,088	35.5%
2001	450/902	49.9%	323/1,489	21.7%
2002	783/1,918	40.8%	491/2,369	20.7%
2003	980/1,599	61.3%	863/2,099	41.1%
2004	809/1,380	58.6%	654/1,821	35.9%
2005	745/1,304	57.1%	386/1,451	26.6%
合 計	5,825/10,557	55.2%	3,718/11,734	31.7%

表 6. 1999 年至 2005 年犬腦組織狂犬病抗原檢驗結果皆為陰性

	1999年	2000年	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年	合計
家犬	29	2	27	3	6	9	3	79
流浪犬	5	10	1	53	68	79	92	308
合計	34	12	28	56	74	88	95	387

參考文獻

1. 李淑慧、丁履紉。研習狂犬病診斷技術。行政院農業委員會所屬各機關出國報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2000。
2. 李淑慧、張國慧。研習牛海綿狀腦病診斷技術。行政院農業委員會所屬各機關出國報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2001。
3. 張國慧、李淑慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺。牛海綿狀腦病實驗室診斷技術之建立與監測。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告年報 37: 1-7, 2001。
4. Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian Dis* 47(3 Suppl):817-822, 2003
5. Barlow RM, Middleton DJ. Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 126: 111-112, 1990
6. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996
7. Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 125: 64-70, 2001
8. Graber HU, Meyer RK, Fatzer R, Vandevelde M, Zurbriggen A. In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Med Assoc* 42: 453-459, 1995
9. Green AJE, Jackman R, Marshall TA, Thompson EJ. Increased S-100b in the cerebrospinal fluid of some cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 107-109, 1999
10. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997
11. Jones V, Martin TC, Keyes P, Dawson M. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 139: 360-363, 1996
12. Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H. Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch Virol* 149(11): 2095-2104, 2004
13. Lee, K-H., Jeng C-R., Pang V F, Chang CC, Cheng I C, Chung W-B, Chueh L-L. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by in situ hybridization. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 24:16-23, 1998
14. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. World Health Organization, Laboratory techniques in rabies. pp. 157-174, 1996
15. Nili H, Asai K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol* 31(3):247-252, 2002
16. Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandevelde M, Moser M. Application of Prionics® Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol, Supp* 16: 189-195, 2000
17. Office International des Epizooties (OIE). Bovine Spongiform Encephalopathy. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5th Edition. Part 2, Chapter 2.3. 13, 2004
18. Office International des Epizooties (OIE). Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy. In: *Terrestrial Animal Health Code*. Part 3, Appendix 3.8.4, 2003.

19. Prusiner SB, Kingsbury DT. Prions-infectious pathogens causing the spongiform encephalopathies. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol* 1: 181-200, 1985
20. Robey WG, Jackson R, Walter RL, Brackett CA, Harrington CA, Killian WR. Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle. *Vet Rec* 143: 50-51, 1998
21. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathologica* 98: 437-443, 1999
22. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276: 31479-82, 2001
23. Wallis M, Velleca BS, Francis TF. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control, Laboratory Methods for detecting Rabies, 1981.
24. Wells GAH, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec* 125: 521-524, 1989
25. WHO website (<http://www.who.int/rabies/>)

Surveillance and monitoring on transmissible spongiform encephalopathy and rabies in Taiwan in 2005

Lee SH*, Chang KH, Tsai KR, Chang JC, Hung CT

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract In our laboratory, the methods of histopathology, immunohistochemistry, Western immunoblot assay, and enzyme-linked immunosorbent assay techniques have been applied for the continuous surveillance of BSE. For this surveillance, we collected a total of 571 brains specimens randomly, age of over 24-month-old cattle from the abattoirs, M.tuberculosis-contaminated farms, and from the culling old cattle in Taiwan in 2005. On the cattle farm, cattle with central nervous signs or other symptoms were included. Additionally, 21 brains specimen from culled old goat were examined for TSE. All the specimens were negative. The results indicate free status of TSE in Taiwan. BSE and TSE aside, we also monitored rabies in 2005. A total of 2,772 sera samples including 1,304 samples from domestic dogs and 1,451 samples from stray dogs were examined for rabies by the method of enzyme-linked immunosorbent assay. The results show that the sero-positive rate of domestic and stray dogs were 57.1% (745/1,304) and 26.6% (386/1,451), respectively. The data indicate that even though the vaccine against rabies is readily available, it is not popular as desired. Besides those techniques described above, methods of histopathological observation, direct immunofluorescent antibody and immunohistochemistry were also applied to detect rabies antigens and typical lesions. A total of 118 brain specimens including 23 smuggled dogs, 92 stray dogs, and others were examined. All the specimens were negative indicating free status of rabies in Taiwan.

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute