

2003 年台灣犬隻狂犬病監測結果

李淑慧*、張國慧、蔡國榮

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 自 2003 年 1 月至 12 月止應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法及免疫組織化學染色技術，檢測 6 例具神經症狀疑似狂犬病病例及 68 例流浪犬之腦組織，結果皆未檢測出狂犬病抗原及特徵性病變，證實台灣至今仍為狂犬病之非疫區。另應用酵素連結免疫吸附法檢測 3,658 件犬隻血清中狂犬病抗體，其中家犬佔 1,559 件，血清抗體陽性數有 980 件；陽性率為 62.9%，流浪犬佔 2,099 件，血清抗體陽性數有 863 件；陽性率為 41.1%。

關鍵字：台灣、狂犬病、監測

緒

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

言

狂犬病為人畜共同傳染病之一，所有溫血動物皆會感染，包括人、犬、貓、牛、羊、馬、野生動物及小白鼠等，人或家畜受到狂犬病畜咬傷時，病畜唾液中之狂犬病病毒會經由傷口感染而進入被咬者體內，最後到達中樞神經，引起嚴重之神經症狀，繼而造成肌肉麻痺、昏睡和死亡。本病亦稱為恐水症，係因病犬咽部肌肉發生痙攣，口渴時飲水困難之症狀。本病病原為桿狀病毒科(Rhabdoviridae)之 Lyssavirus 病毒屬。病毒顆粒大小為 75 x 180nm，形如砲彈狀，具外膜(envelope)，病毒核酸屬於線狀單股 RNA 病毒。本病為古老之疾病，分佈全世界，本省早年亦有本病發生，後進行嚴格的犬隻預防接種及野犬撲滅等措施，於民國 48 年 3 月以後就無病例發生之報告。本病之傳播為被患有狂犬病動物咬傷後感染，引起疾病傳播的重要動物認為有犬、狐狸、貓鼬、臭鼬、狼

及吸血蝙蝠等。除了少數國家或海島地區沒有狂犬病外，許多國家普遍有本病發生，

據 O.I.E 的資料顯示於 1998 年丹麥、法國、印尼等國家仍有狂犬病的病例報告。據世界衛生組織 2001 年資料，估計全世界每年約有四萬人至七萬人死於本病，以亞洲及非洲國家發生較多，而與我國有經貿往來國家並申請為非疫區者僅英國、澳大利亞、日本、瑞典、紐西蘭及冰島等六國。在美國、加拿大及西歐等國家因為徹底實施犬隻狂犬病預防注射，狂犬病已成為地方性疾病，依據美國疾病管制與預防中心 (CDC) 資料顯示【2】，2000 年全美 49 州、哥倫比亞特區及波多黎各共發生 7,369 例動物狂犬病病例，其中絕大多數為野生動物 6,855 例(93%)，家畜僅(6.9%)，野生動物病例主要發生在浣熊、臭鼬、蝙蝠、狐狸及齧齒類等亦有零星發生，Krebs 等人指出【3】2001 年 CDC 統計狂犬病病例數有 7,438 例，包括人類病例 1 例，野生動物為 6,939 例(93%)，家畜有 497 例(6.7%)，動物發生頻度依序集中於浣熊、臭鼬、蝙蝠、狐

狸、貓、狗及牛，其中貓是最常被報告發生感染的家畜，而與 2000 年病例比較，狗的病例減少（自 122 例減少至 89 例），而貓的病例反而增加（249 例增為 270 例）。上述於美國發生的病例中，少有人類的病例，據美國 CDC 網站資料，本世紀每年狂犬病所造成的死亡人數自 100 人（或更多）遞減為 1 或 2 人，這現象與犬隻實施狂犬病疫苗注射及日益進步的治療方法有絕對關聯。

近年來兩岸往來頻繁加上走私猖獗，許多人畜共通傳染病可能會隨著走私管道而引入，如馬來西亞發生之立百病、大陸之狂犬病、香港之禽流感、澳洲之亨德拉病、英國之牛海綿狀腦病及美國紐約之西尼羅病等，這些惡性人畜共通傳染病外觀上皆無特異病徵，無法由肉眼診斷，一定需仰賴病理學及病原分離方可確診，然病原分離常受限於設備及人員之素質與經驗，且有散播病原之虞，而免疫病理診斷技術則可彌補前者之缺點，安全迅速地於第一時間內應用免疫病理學之技術於福馬林固定後之組織細胞中偵測出病原，達到確診疾病之目的，進而控制及消滅該病，故人畜共通傳染病免疫學診斷實驗室之建立，實為刻不容緩。目前本所已依世界動物衛生組織訂定之診斷標準，建立符合實驗室生物安全之狂犬病診斷實驗室。應用組織病理學、免疫組織化學染色法及酵素連結免疫吸附法等實驗室標準診斷流程並持續進行本病之監控計畫。本報告將已建立之狂犬病實驗室診斷方法詳加說明，並報告目前之監測結果。

材料及方法

除以組織病理學檢查外，需配合直接免疫螢光標示抗體檢查法、免疫組織化學染色法及病毒分離結果進行確診，茲將已建立之實驗室診斷與監測方法詳述如後：

組織病理學診斷

本法是以傳統的組織病理診斷方法將腦組織製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)。

1. 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。

2. 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中 24 小時。取出切片水洗再置於 1.5% 氫氧化鈉酒精溶液 10 分鐘，使切片染成粉紅色判讀之。動物若有狂犬病感染，可在神經元細胞質內觀察到狂犬病特異性之病毒包涵體 - 奈格利小體 (Negri bodies)，奈格利小體為朱紅色，神經元細胞核為紫紅色，核染色質為藍色、紅血球為粉紅色。

3. 直接免疫螢光標示抗體檢查法

(Direct immunofluorescent test)：

本法是狂犬病最快速且準確的標準診斷方法，各國狂犬病診斷實驗室對疑似狂犬病的動物檢體皆採用本檢查法，其敏感性比接種小白鼠分離病毒高【1,4,5,6】法是將感染動物的腦組織作成捺壓片後，以 FITC (fluorescein) 螢光標示之狂犬病單株抗體來染色，該標示抗體若與狂犬病抗原結合後會形成抗原抗體結合體，在螢光顯微鏡下被紫外光源照射激發而發出綠色螢光；若檢體沒有狂犬病抗原則不會被染色而不具螢光。

Rabies 免疫組織化學染色法

利用對狂犬病病毒糖蛋白 (glycoprotein) 特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測腦組織中的狂犬病抗原【1,4,5,6】。其組織切片製作方法與組織病理學診斷之步驟相同，但每次染色需同時染陽性對照。組織切片經脫蠟後，以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗 3 次，置於 1bar 121°C 高溫高壓滅菌器中 20 分鐘後，再以上述 PBS 洗 3 次後置於甲醇-雙氧水溶液中 5 分鐘以去除內源性過氧化，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。在組織上滴滿狂犬病病毒單株抗體 (1:500, Rabies virus Ab-1, Clone Rab-50, mouse monoclonal antibody, NeoMarkers®)，置於 37 °C 4 小時或 4°C 隔夜，再滴滿次級抗體 (biotinylated secondary antibody, DAKO ChemMate Detection

Kits), 室溫 10 分鐘, 以 PBS 沖洗, 組織上滴滿受質 (peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate Detection Kits), 置於室溫 10 分鐘。組織上滴滿呈色劑 (AEC or DAB substrate, DAKO ChemMate Detection Kits), 用蒸餾水洗。最後以蘇木精複染, 封片後置於顯微鏡下鏡檢。DAB 染色試劑陽性者於神經元細胞質內會出現褐色顆粒沉積或聚集的抗原; AEC 染色試劑陽性者則可見紅色顆粒沉積或聚集。

Rabies 酵素連結免疫吸附法檢測抗體

將待測血清或血漿以 56°C 30 分鐘非變性。將 96 孔抗原盤從 4°C 冰箱中取出, 置於室溫中回溫。取一新的 96 孔盤稀釋盤, 加入 150 μ L ELISA 緩衝液至 B1、B2、C1、C2、D1、D2 微量孔中, 其餘各微量孔則加入 203 μ L ELISA 緩衝液。將各二重覆 7 μ L 的待測血清由 F1、G1 起依序加至 G12、H12 已有緩衝液之微量孔中, 一盤可做 43 個檢體。陽性對照二重覆進行 30 倍序列稀釋: 由 A1、A2 孔各取 75 μ L 至 B1、B2 孔, 混合均勻後取 75 μ L 至 C1、C2 孔, 混合均勻後取 75 μ L 至 D1、D2 孔。打開 96 孔抗原盤包裝, 甩掉盤內油性之保存液, 倒置於毛巾或吸水紙上拍乾, 以盡量將液體除去。每孔加入 250 μ L 清洗液, 然後甩掉盤內清洗液, 倒置於毛巾或吸水紙上拍乾, 如此重覆清洗四次。將 96 孔稀釋盤內的稀釋檢體與陽性、陰性對照各取 100 μ L 至相對位置之 96 孔抗原盤內。將 96 孔抗原盤以封盤膜密封, 置於 37°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤, 甩掉盤內液體, 每孔加入 250 μ L 清洗液, 然後甩掉盤內清洗液, 倒置於毛巾或吸水紙上拍乾, 如此重覆清洗四次。每孔加入 100 μ L 結合物溶液 (conjugate), 然後以封盤膜密封, 置於 37°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤, 甩掉盤內液體, 每孔加入 250 μ L 清洗液, 然後甩掉盤內清洗液, 倒置於毛巾或吸水紙上拍乾, 如此重覆清洗四次。取等量之 A 液與 B 液混合均勻, 配製成受質溶液 (使用前再配)。每孔加入 100 μ L 受質溶液 (substrate), 置於室溫 15 分鐘。每孔加入 50 μ L 停止液混合均勻, 以終止反應。10 分鐘內以 ELISA reader 讀取波長 450 nm 之吸光值及以 620 nm 為參考波長來判讀結果。當檢測樣本吸光值 (OD value) 大於陰性對照吸光值加 0.1 時則判定為抗體陽性; 反之小於陰性對照吸光值加 0.1 者判為抗體陰性。

採樣及監測方法

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狂犬病抗體, 以了解台灣犬隻對抵抗狂犬病病毒 (疫苗毒) 產生抗體之能力。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檢測狂犬病抗原。若臨床上遇有神經症狀或是疑似狂犬病或犬瘟熱病例犬隻, 應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法、免疫組織化學染色法等技術, 檢測其腦組織中狂犬病抗原之有無。

結 果

本所為瞭解本省狂犬病之防疫情況, 自八十六年度起開始持續進行犬隻狂犬病之監控與血清抗體調查, 九十二年度狂犬病抗體共檢測 3,658 件犬隻血清結果, 陽性率為 50.4 %, 其中家犬計 1,559 件, 陽性血清數為 980 件; 陽性率為 63.0 %; 野犬計 2,099 件, 陽性血清數為 863 件; 陽性率為 41.1 %。(詳如表一) 有關狂犬病抗原監測, 收集臨床上有神經症狀犬隻及台北市、台北縣、台中市、台南市、台南縣、高雄市、屏東縣、花蓮縣、台東縣及金門縣等十個家畜疾病防治所 (動物防疫所) 送檢之流浪犬腦組織, 應用組織病理學技術、免疫螢光抗體染色及 RT-PCR 檢測腦組織中是否具有狂犬病病毒 (詳如圖一), 九十二年度共檢測 68 例流浪犬腦組織及 6 例家犬疑似病例, 結果皆無狂犬病特徵性病變, 綜合我國仍為狂犬病之非疫區, 血清抗體陽性率 62.9% 判定為疫苗注射之反應。

討 論

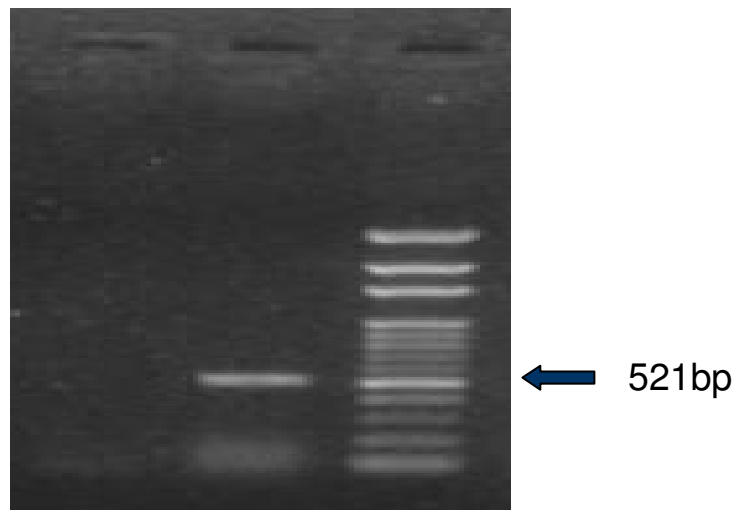
綜觀九十二年度台灣家犬狂犬病抗體陽性率為 62.9 %, 顯示國內犬隻具有抵抗狂犬病病毒入侵之能力仍有提昇之空間, 臺灣四周國家除日本外皆為狂犬病疫區國, 尤其兩岸走私猖獗仍時有耳聞, 難保狂犬病毒藉由走私管道入侵, 當務之急應加強全民對此疾病之認識, 呼籲其定期對自己飼養之家犬注射狂犬病疫苗, 嚴格控管流浪狗且減少其族群之擴張。使 80% 以上畜犬具有抵抗狂犬病病毒入侵之能力, 如此方能免於狂犬病入侵之威脅。

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. CDC internet data. United States rabies surveillance data, 2000
3. Krebs JW, Noll HR, Rupprecht CE, Childs JE. Rabies surveillance in the United States during 2001. J Am Vet Med Assoc 221(12):1690-1701, 2002
4. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. World Health Organization, Laboratory techniques in rabies. pp. 157-174, 1996
5. Texas department of Health. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control, Rabies procedure Manual, 1996
6. 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



圖一、應用聚合酵素反應RT-PCR檢測腦組織中是否具有狂犬病病毒特異核酸序列。

M: 100 bp DNA ladder ; +: 狂犬病固定毒接種小鼠的腦組織 ;

-: 正常小鼠的腦組織。

表一、2003 年犬隻狂犬病疫苗抗體 ELISA 檢驗結果

來 源	血清學檢驗數量	陽性數(陽性率)
家 犬	1,559	980 (62.9%)
流浪犬	2,099	863 (41.1%)
合 計	3,658	1,843 (50.4%)

Surveillance on rabies of dogs in Taiwan in 2003

Shu-Hwae Lee*, Kuo-Hui Chang, Kwok-Rong Tsai

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive of Yaun

SUMMARY Histopathological observation, direct immunofluorescent antibody and immunohistochemistry were applied to examine 6 rabies-suspected cases with nervous symptom and 68 brain tissues of stray dogs during January to December 2003. Rabies viral antigens and typical lesion were not detected in all tissues indicating free situation of Taiwan of rabies. On the other hand, 3,658 sera samples including 1,559 samples from domestic dogs and 2,099 samples from stray dogs were examined by the enzyme-linked immunosorbent assay. Results showed that the sero-positive rate of domestic and stray dogs were 62.9% (980/1,559) and 41.1% (863/2,099), respectively.

Keywords: Taiwan, Rabies, Surveillance

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute

