

# 以聚合酶鏈反應技術檢測豬瘟帶毒豬

林榮培\* 黎南榮 林有良 林敬覆  
黃天祥 楊揚輝

台灣省家畜衛生試驗所豬瘟研究系

**摘要** 為解決牧場豬隻持續排毒或保毒狀態所造成之豬瘟病毒污染問題，就豬瘟污染場由抗体之高低以及豬瘟發生之久暫，以聚合酶鏈反應等技術試行檢出豬瘟帶毒豬。結果由高豬瘟中和抗体（1024 X）及低中和抗体（4 X 及 8 X）母豬之鼻、肛拭液與臟器試材均未能檢出豬瘟病毒或以反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 偵測出病毒核酸。

北部某縣某一健康場雖每個月篩檢母豬 10 頭小豬 50 頭，篩檢一整年均未檢出豬瘟病毒，其豬瘟中和抗体也維持在正常之範圍內，母豬抗體均高於 32 X。小豬則由 8 X 到 384 X 之間，平均為 32 X。

北部某縣及南部某縣發生豬瘟一個月後之豬場各一場，其母豬 22 頭及小豬 31 頭之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，進行 RT-PCR 測試，結果可從數頭小豬及母豬之鼻及肛門拭液中檢測出豬瘟病毒核酸。

本試驗中 RT-PCR 之偵測與以細胞繼代分離之結果相一致，但是 RT-PCR 之檢測較細胞分離快速甚多，似可以 PCR 檢出豬瘟感染場中慢性感染持續排毒之豬隻，並加以淘汰。

**關鍵詞：**聚合酶鏈反應，豬瘟，豬瘟帶毒豬

## 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<sup>[10]</sup> 在本所開發的免化疫苗 (LPC-China)，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，經多次免疫適期探討結果，初生仔豬利用哺乳前免疫及哺乳後三小時內接種豬瘟疫苗，而於八週齡時均能耐過強毒之攻擊<sup>[2, 9, 11]</sup>，但大部份小豬皆成為健康排毒豬。再者劉等<sup>[3]</sup> 則於哺乳前，或哺乳後一至八小時，接種豬瘟疫苗而於八週齡時經豬瘟強毒攻擊結果，雖大多

數豬隻均能發病但可耐過，然而大部份耐過豬於內臟可見慢性豬瘟病變<sup>[3]</sup>。何等<sup>[1]</sup> 則於哺乳前，或哺乳後一至六週齡時，接種豬瘟疫苗而於八週齡時經豬瘟強毒攻擊結果，雖大多數豬隻均能耐過，但大多數豬隻臨床上仍有發熱現象。此等現象表示免疫仔豬雖然臨床上能耐過強毒的攻擊，然已有發病現象而且極可能有散佈病毒。實際上，Lai and Ho<sup>[8]</sup> 以移行抗體價低於八倍之八週齡豬所作試驗結果顯示，攻擊後之免疫豬大部份會有病毒血症及尿中排毒現象的發生。

由 Lai and Ho<sup>[8]</sup>、劉等<sup>[3]</sup>、何等<sup>[1]</sup> 試驗結果可推論，於野外條件下，這些不完全免疫豬隻於接觸強毒後，臨床上可能表現正常，但會時常排毒並引起豬群中其他不完全免疫豬隻的感染發病而斃死或呈保毒狀態。因此，要徹底撲滅豬瘟，除了要有健全的豬瘟免疫方式，對於健康排毒豬及

\*抽印本索取者  
台灣省家畜衛生試驗所

不顯性感染豬瘟豬隻之摘除也是一項刻不容緩的工作。本試驗擬就豬瘟污染場由抗体之高低以及豬瘟發生之久暫，以反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 等技術建立摘除的方法，以便解決牧場豬隻持續排毒或保毒狀態所造成之污染問題。

## 材料與方法

### 豬瘟病毒分離用細胞：

CPK 或 PK-15 株化細胞，由本所製劑研究系分讓。以細胞培養液 (MEM, GIBCO 出品) 加 10% 胎牛血清，100  $\mu$ /ml 青黴素，100  $\mu$ g/ml 鏈黴素，培養於細胞培養玻片 (chamb slide, NUNC 出品)，形成單層細胞時供用。

### 豬瘟中和抗体測定：

豬瘟中和抗体測定分析，參考劉等<sup>[3]</sup>及賴等<sup>[4]</sup>之方法，以 END (Exaltation of newcastle disease virus) 微量測定法實施。

#### (一) 抗体測定及病毒分離：

1. 自彰化、台南、高雄、屏東等四縣各選取過去曾發生過豬瘟之 10 個豬場，每場逢機選取母豬 20 頭，肉豬 30 頭，採取血清以 END 法測定其豬瘟中和抗体力價，以探討慢性感染，健康帶毒及不顯性感染豬瘟豬隻抗体產生情形，並與正常豬隻抗体產生情形作分析比較。於高雄縣選取一免疫良好、未曾發生過豬瘟、衛生管理甚佳之種豬場做為對照組。
2. 選取豬瘟 END 抗体最高之母豬 7 頭剖檢及採集其臟器與血液進行病毒分離，並以螢光染色法偵測病毒之存在。將病材乳劑及血液做十倍系列稀釋，接種於已形成單層細胞之 CPK 或 PK-15 株化細胞，增殖 4 天後，以豬瘟螢光標示抗体染色，觀察有無豬瘟病毒。
3. 第二年再由彰化、台南、屏東等三縣，於第一年曾測過豬瘟 END 中和抗体之 1,300 頭母豬中，選取 END 中和抗体低於 32 X 者，採取其脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗体染色，觀察有無豬瘟病毒。同時再測其 END 中和抗体。
4. 選取抗体力價最低之母豬數頭，剖檢採取臟器進行病毒分離。並以螢光染色法偵測病毒之存在。
5. 上述試材乳劑、脫纖血、鼻及腔黏液等試材，

以反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 技術偵測有無豬瘟病毒核酸。

6. 由宜蘭、台南等地區過去曾發生過豬瘟之豬場，每月定期採取母豬及 8 週齡子豬，或於豬瘟發生後一段時間，採取其脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗体染色，觀察有無豬瘟病毒。同時再測其 END 中和抗体。
7. 選取數頭子豬剖檢採取臟器進行病毒分離。並以螢光標示抗体染色法 (FA) 偵測病毒之存在。接種培養細胞：將試材乳劑及血液做十倍系列稀釋，接種於已形成單層細胞之 CPK 或 STY 株化細胞，增殖 4 天後，以豬瘟螢光標示抗体染色，觀察有無豬瘟病毒。
8. 上述試材乳劑、脫纖血、鼻及腔黏液等試材，以反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 技術偵測有無豬瘟病毒核酸。

#### (二) 反轉錄聚合酶鏈反應試驗：

- 以反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 技術<sup>[6]</sup> 偵測採集之豬隻剖檢臟器及血液內病毒核酸及探討 PCR 偵測的結果與豬隻抗体力價，病毒分離情形及病理變化的相關性。其方法如下：
- (1) 病毒核酸之萃取：100  $\mu$ l 之試材乳劑與 1000  $\mu$ l 之 Trizol 試劑混合後，加 200  $\mu$ l 之 chloroform 萃取，4  $^{\circ}$ C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清，再經等量 Isopropanol 沉澱一次。沉澱物加入 100  $\mu$ l 之 100% alcohol，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  $\mu$ l 即得。
  - (2) 引動子 (primers)：豬瘟引動子是由劉世東博士所設計提供者。2 個引動子 primers 1 (5'-TGCCCCCTGTTTGAAGAGC-3') 及 primers 2 (5'-TGGTGGAAGTTGGTTGTGTC-3')，由廠商所製備，其產物長度為 459 bp。
  - (3) 反轉錄與聚合酶鏈反應：將萃取好之試材核酸，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、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  $\mu$ l，以 thermal cycler 進行反轉錄及聚合酶鏈反應。其反應為經 42  $^{\circ}$ C 作用 40 分鐘反轉錄，接著為變性 (denature) 溫度 94  $^{\circ}$ C 維持 35 秒，然後降低到 45  $^{\circ}$ C 讓引動子與模板結合維持 70 秒，再將溫度提高到 72  $^{\circ}$ 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% 瓊脂 (agarose gel)，用 10  $\mu$ l 之聚合酶反應產物進行電泳分析。以 100 bp DNA ladder 當分子量標記。

## 結 果

### 試驗一：

於彰化、台南、高雄、屏東等四縣各選取過去曾發生過豬瘟之 10 個豬場，每場逢機選取母豬 20 頭，肉豬 30 頭，採取血清以 END 法測定其豬瘟抗体結果，以 END 法測得之彰化、台南、高雄三縣母豬之豬瘟抗体，其曲線高峰均在 32 X，屏東縣較高其高峰在 512 X，最高者 1024 X。少數母豬之豬瘟抗体在 2 X 或以下。肉豬（包括小豬）於彰化縣其曲線高峰在 16 X，台南縣為 4 X，但甚多 2 X 或以下者，高縣也在 4 X，屏東縣較高，在 64 X~128 X，但也有將近 40 頭在 2 X 或以下者。對照組高雄縣未曾發生豬瘟之某種豬場，其曲線高峰則在 64 X。

選取屏東縣豬瘟 END 抗体最高之母豬 7 頭，解剖採取扁桃腺、肺、肝、脾、腎、顎下淋巴、肺門淋巴、腸間膜淋巴、鼠蹊淋巴、血液、鼻腔拭液等進行病毒分離，並以 RT-PCR 偵測各試材內之豬瘟病毒，結果均未能檢出豬瘟病毒。

### 試驗二：

- (1)由彰化、台南、屏東等三縣上一年曾測過豬瘟 END 中和抗体之 1,300 頭母豬中，選取 END 中和抗体低於 32 X 者，採取其脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗體染色，觀察有無豬瘟病毒。同時再測其 END 中和抗体。結果於屏東縣 32 頭抗体低於 32 X 之母豬經再測其豬瘟 END 中和抗体結果均低於 32 X，都在 2~16 X 之間。台南縣 50 頭母豬之豬瘟 END 中和抗体除一頭為 64 X，二頭為 32 X 其餘則在 4~16 X 之間。彰化縣 56 頭母豬之豬瘟 END 中和抗体除一頭為 64 X，二頭為 32 X 外其餘也都在 4 X~16 X 之間。詳如表 1。
- (2)上述 138 頭母豬之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗體染色，結果均未能檢出豬瘟病毒。

- (3)選取台南縣豬瘟 END 抗体 4 X 之母豬 5 頭，8 X 之母豬 1 頭，解剖採取扁桃腺、肺、肝、脾、腎、顎下淋巴、肺門淋巴、腸間膜淋巴、鼠蹊淋巴、血液、鼻腔拭液等進行病毒分離，結果未能檢出豬瘟病毒。

表 1 彰化、台南、屏東縣母豬之豬瘟 END 抗体力價

END 抗体力價	頭 數			合 計
	彰化縣	台南縣	屏東縣	
2 X			7	7
4 X	13	18	8	39
8 X	31	26	9	66
16 X	7	3	10	20
32 X	2	2		4
64 X	1	1		2
合 計	54	50	34	138

- (4)聚合酶鏈反應試驗：上述 138 頭母豬之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，以及台南縣 6 頭解剖母豬之臟器試材，以 RT-PCR 偵測各試材內之豬瘟病毒，結果均未能檢出豬瘟病毒核酸。

### 試驗三：

- (1)由宜蘭、台南等地區過去曾發生過豬瘟之豬場，每月定期採取母豬及 8 週齡小豬，或於豬瘟發生後一段時間，採取其脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗體染色，觀察有無豬瘟病毒。同時再測其 END 中和抗体。結果於宜蘭縣 A 豬場由 83 年 1 月至 12 月每月採取母豬 10 頭小豬 50 頭，測其豬瘟 END 中和抗体結果母豬抗体均高於 32 X。小豬則由 8 X 到 384 X 之間，平均為 32 X。
- (2)上述 720 頭豬隻之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，於 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代三代並以豬瘟螢光標示抗體染色，結果均未能檢出豬瘟病毒。
- (3)聚合酶鏈反應試驗：上述 720 頭豬隻之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，以 RT-PCR 偵測各試材內之豬瘟病毒，結果均未能檢出豬瘟病毒核酸。

## 試驗四：

(1) 選取北部某縣及南部某縣發生豬瘟一個月後之豬場各一場，採取其母豬 22 頭頭及小豬 31 頭之脫纖血、鼻及腔黏液等試材，進行病毒分離、RT-PCR 檢測並測其 END 中和抗體力價。結

果可從數頭小豬及母豬之鼻及肛門拭液中檢測到豬瘟病毒。詳如表 2 及圖 (1)。將檢測出之豬瘟病毒核酸，經與 LPC 毒比對結果並非 LPC 毒。LPC 毒之引動子 HCT 31, 32 由林有良所提供，其產物長度為 389 bp。

表 2 發生豬瘟一個月後之豬場小豬及母豬豬瘟 END 抗體力價與病毒分離

END 抗體力價	頭 數				合 計	病 毒 分 離			
	A 場		B 場			小 豬		母 豬	
	小 豬	母 豬	小 豬	母 豬		鼻 腔	肛 門	鼻 腔	肛 門
2 X			1		1	1/1	1/1		
4 X	1		1		2	1/2	1/2		
8 X	2		3		5	4/5	4/5		
16 X									
32 X	2		2		4	0/4	0/4		
64 X			4	1	5	0/4	0/4	0/1	1/1
128 X		3	6	2	11	0/6	0/6	0/5	0/5
256 X	4	2	2	2	10	0/6	0/6	0/4	0/4
≥384 X	2	7	1	5	15	0/3	0/3	0/12	0/12
合 計	11	12	20	10	53	6/31	6/31	0/22	1/22

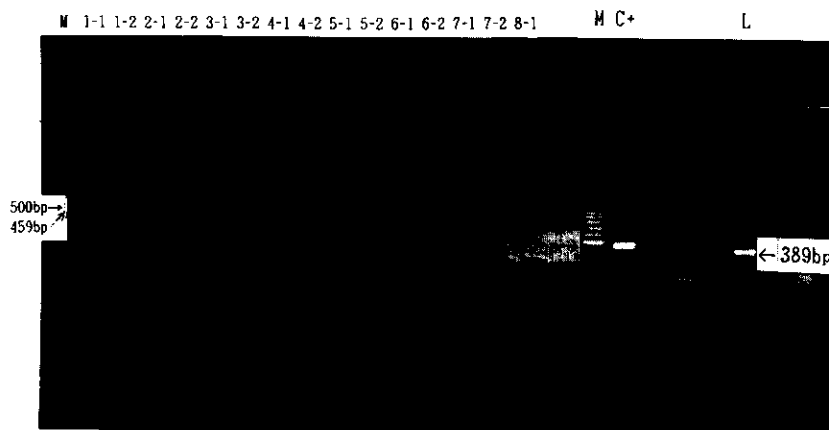


圖 1 以 RT-PCR 檢測豬瘟感染後豬場豬隻鼻及肛門拭液結果

M：100bp DNA ladder 標記。

1-1：第 1 號豬鼻腔拭液。

1-2：第 1 號豬肛門拭液，餘類推。

8-1：陰性對照。

C+：陽性對照，產物長度 459 bp。

L：LPC 疫苗毒，產物長度 389 bp。

## 討 論

由彰化、台南、高雄、屏東等四縣過去曾發生過豬瘟之 10 個豬場，檢測其豬瘟抗体結果，彰化、台南、高雄三縣母豬之豬瘟 END 中和抗体，其曲線高峰均在 32 X，但對照組高雄縣未曾發生豬瘟之某種豬場，其曲線高峰則在 64 X，與之相較，對照組明顯高出一階。楊等<sup>[5]</sup>報告於 1972 年檢測全省母豬豬瘟 END 抗体其百分比以 128 X 最高，與彰化、台南、高雄三縣母豬之豬瘟 END 中和抗体，又高出二階。但，屏東縣過去曾發生過豬瘟之豬場，其豬瘟抗體曲線高峰在 512 X，最高者 1024 X，比起對照組高出三階之多。其中牽涉到免疫等諸多問題甚值得再詳加探討。但總體言之，曾發生過豬瘟之豬場，其豬瘟中和抗体價一般偏低，少數母豬之豬瘟抗体且在 2 X 或以下。肉豬（包括小豬）於彰化縣其曲線高峰在 16 X，台南縣為 4 X，但甚多 2 X 或以下者，高縣也在 4 X，屏東縣較高，在 64 X~128 X，但也有將近 40 頭在 2 X 或以下者。這些抗體偏低者如何抵抗野外豬瘟之侵襲，甚為可慮。

對高抗体 (1024 X) 母豬進行病毒分離，其構想基於病毒之持續刺激使抗体維持高檔，但是試驗結果均未能分離到病毒，或檢出病毒核酸，可能為母豬本身因抗体高，病毒已被清除而不存於體內，或是因抗体高使病毒存於不易分離之部位，或是因高抗体使病毒分離不易。

由於上述之實驗未能分離或檢出病毒，因而改變方向選取豬瘟 END 抗体低之母豬進行病毒分離及 PCR 偵測。試材以 STY 或 CPK 株化細胞連續培養繼代 3 代結果均未發現豬瘟病毒，PCR 偵測也未偵測出豬瘟病毒核酸。有趣的是豬瘟 END 抗体低之母豬，第二年再檢測其抗体時，依然偏低。

Stewart 等<sup>[13]</sup>報告，母豬於懷孕中感染豬瘟病毒會產生持續感染之小豬，且可持續 11 個月。Oirschot<sup>[12]</sup>報告持續感染豬瘟之豬隻，其抗体均不高。試驗二中未分離到豬瘟病毒，可見豬瘟帶毒篩檢之不易，其篩檢之方法尚須再加以檢討。

由試驗三得知，健康場雖每個月篩檢，篩檢一整年均未檢出病毒，其豬瘟中和抗体也維持在正常之範圍內，可見只要豬瘟免疫及衛生管理做得好，應可防止豬瘟之發生。

最後，由豬瘟發生場開始追蹤，於發生豬瘟一個月後之豬場之小豬分離到豬瘟病毒，且檢出

病毒之小豬其 END 中和抗体均在 8 X 以下，但一頭檢出病毒之母豬其抗体則甚高，值得再探討。第二個月再前往檢驗時，因畜主之補強注射與不良豬之淘汰而無法再檢出病毒。由此可見豬瘟感染場中確有慢性感染持續排毒之豬隻存在。

本試驗中 RT-PCR 之偵測與以細胞繼代分離之結果相一致，但是 RT-PCR 之檢測較細胞分離快速甚多，似可以 RT-PCR 檢出豬瘟感染場中慢性感染持續排毒之豬隻，並加以淘汰。

## 參考文獻

1. 何維莊、費昌勇、黃天祥、曹素華。豬隻疾病預防適期之免疫效果研究。(1) 豬瘟移行抗體與免疫效果之關係。農委會豬隻重要疾病之研究報告。143-157. 1990.
2. 林敬覆、李龍湖、黎南榮、費昌勇。豬瘟免疫適期與田間毒株病原性之研究。農委會動物用生物藥品之開發。1-12. 1988.
3. 劉培柏、黎南榮、費昌勇、邱仕炎。哺乳前及哺乳後新生仔豬之豬瘟免疫。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告。No. 23: 109-119. 1987.
4. 賴秀穗、何維莊、曹素華、林榮培、林敬覆。新生仔豬之豬瘟免疫與初乳吸收之關係。73 年度農建計畫，1-17. 1985.
5. 楊喜金、賴俊雄、張天桂、劉燃炎、吳義興、詹益波、劉義雄、陳守仕、劉永和。豬瘟中和抗体之研究：第三報 仔豬豬瘟預防注射適當時期之預測。台灣畜衛試研報。No. 9: 21-42. 1972.
6. Henry A. Erlich, Richard Gibbs, Haig H. Kazazian, Jr. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
7. Gregor M., Tillmann R. and Heinz J. T. Molecular Cloning & Nucleotide Sequence of the Genome of Hog Cholera Virus. Virology 171: 555-567. 1989.
8. Lai S. S. and W. C. Ho. Experimental superinfection of hog cholera virus in immunized pigs. Chinese Soc. Vet. Sci. 12: 25-29. 1986.
9. Lai S. S., W. C. Ho and S. H. Tsao. Absorption of colostrum antibodies and neonatal vaccination against hog cholera. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 12: 117-123. 1986.

10. 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 control in Taiwan. NSC Spec. Publ. 5 : 1 - 44. 1981.
11. Lee C. T. Robert, J. T. Wang, S. S. Lai and Tracy T. C. Lin. Studies on precolostral vaccination against hog cholera using an attenuated virus LPC-China strain. 6th IPVS congress proceeding. P 133. 1980.
12. Oirschot J. T. Van. A congenital persistent swine fever infection. II. Immune response to swine fever and unrelated antigens. Vet. Microbiol 2 : 133 - 142. 1977.
13. Stewart W. C., Carbrey E. A. and Kresse J. I. Transplacental hog cholera infection in susceptible sows. Am. J. Vet Res. 34 : 637 - 640. 1973.

## Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Hog Cholera Carriers

Lin, Y. P.,\* N. J. Li, Y. L. Lin, K. F. Lin,  
T. S. Hung and Y. H. Yang

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

**SUMMARY** The serum samples of sows and young pigs were collected from the areas of Pintung, Koashiung, Tainan and Changhuan, that farms had HC occurred more than one year ago. The highest titer against HC was 1 : 1024 in Pintung.

Next year, a total of 138 serum samples were collected from low titer of sows and tested the HC titers again. The results were still low. It's ranging were between 1 : 2~1 : 64, the average ranging was 1 : 8.

To survey the invasion of chronic or clinically healthy carriers or subclinical hog cholera infection, a total of 143 samples were collected from 7 highest and 6 lowest titer sows. The testings include (1) polymerase chain reaction (2) inoculate STY or CPK cells (3) FA test. The results suggest that no HCV could be detected.

To survey the invasion of Hog Cholera Carriers, a total of 138 swab samples were collected from low titer of sows. The testings include (1) polymerase chain reaction (2) inoculate STY or CPK cells (3) FA test. The results suggest that no HCV could be detected. Next, a total of 1440 swab samples were collected from pigs and sows of A farm for every month. The results suggest that no HCV could be detected too. For the HC titers, the serum samples of 720 sows were tested by END method. It's ranging were between 1 : 8~1 : 384, the average ranging was 1 : 32.

The swab samples collected from the farm that occurred HC after one month. there could be detected the HCV from pigs that titer below 8 X.

**Key words:** *Polymerase Chain Reaction; Hog cholera; carriers*

---

\*Corresponding author

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