

28-6

可疑豬瘟及非洲豬瘟病例之檢測

林榮培^{1*} 楊揚輝¹ 黎南榮¹ 潘居祥¹
陳聖怡¹ 宋華聰² 潘英章²

1 臺灣省家畜衛生試驗所

2 行政院農業委員會

野外可疑豬瘟及非洲豬瘟病例131例，將其10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10例為豬瘟感染，11例為豬假性狂犬病病例，無檢出非洲豬瘟病例。由本試驗結果顯示本省無非洲豬瘟病毒潛存。

中(英)文關鍵字

豬 瘟(Hog cholera)

非洲豬瘟(African swine fever)

檢 測(Detection)

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，損失之巨在百億元以上，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，African swine fever (ASF)，最早發生於非洲肯亞，1921年Montgomery⁽¹²⁾將其於1909-1915年間對本病之研究結果發表，

是為本病之第一篇報告。典型的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，高熱及皮膚呈現紫斑，全身內臟出血，初發生地區其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，其病徵較不嚴重，卻很類似豬瘟，必須於實驗室加以診斷。本病目前尚無有效的疫苗，萬一發生本病時必須全面撲殺與隔離，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予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

* 抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所

驗室之診斷，本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)⁽¹³⁾、免疫滲透電泳法^(4,14)、間接螢光抗體法、瓊脂凝膠擴散沉澱法^(5,15)、間接酵素連結免疫吸附試驗⁽⁶⁾等均可用於診斷本病，但本所目前並無非洲豬瘟之診斷試劑，故擬以動物接種^(9,12,15)、血球吸附試驗^(8,9,10)，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⁽³⁾等來檢測此外來惡性動物傳染病。

本篇為筆者於民國79年7月至80年12月對豬瘟與非洲豬瘟監視檢測工作之報告。

材料與方法

動物接種試驗

1. 試驗動物：

選取未經兔化豬瘟疫苗免疫之小豬或選取健康良好之懷孕母豬，分娩後將小豬分成二組，其中一組於5週齡時以本所出品之兔化豬瘟疫苗免疫，2週後其END抗體力價高於96倍豬隻供接種用。另一組則未經兔化豬瘟疫苗免疫，其END抗體力價低於6倍。但二組豬隻均於6週齡時以豬假性狂犬病病毒疫苗免疫。

2. 接種試驗：

各縣市家畜疾病防治所送檢可疑豬瘟之病材，以MEM培養液加5倍抗生素做成10倍乳劑，分別接種於豬瘟疫苗免疫及無免疫豬隻各二頭。每頭各接種5ml，觀察2星期看有無症狀出現。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。如果豬瘟疫苗免疫豬接種後無症狀出現，而無免疫豬接種後出現明顯之豬瘟症狀，則判定為豬瘟之感染。如果豬瘟疫苗免疫豬及無免疫豬均出現明顯之豬瘟症狀，則極可能為非洲豬瘟。

血球吸附試驗 Hemadsorption(Had) reaction

1. 白血球培養(buffy coat)：

選取健康豬以12號採血針採血入脫纖瓶，以玻璃珠脫纖10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100U/ml、鏈黴素100 μ g/ml）。室溫中以800g離心30分鐘，抽取白血球…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，加入保留備用之血清至全量12ml後，上下抽動以沖散白血球。於4 $^{\circ}$ C，800g離心30分鐘。小心抽取白血球層，再放入15ml之透明離心管，加入胎牛血清至全量12ml後，上下抽動以沖散白血球。於4 $^{\circ}$ C，800g離心30分鐘。小心抽取白血球層，放入培養液中（培養液為MEN中加入30%FCS,100U/ml盤尼西林，100 μ g/ml鏈黴素）做成白血球懸浮液。分裝於24孔塑膠培養盤內，每孔0.4ml或分裝於8孔chamber slide內，每孔0.2ml。置於37 $^{\circ}$ C，5% CO₂之培養箱內培養供試驗用。

供豬瘟檢查用之buffy coat則採自未經豬瘟疫苗免疫其豬瘟END抗體力價小於4倍者。

2. 受檢病材：

民國79年7月至80年12月各縣市家畜疾病防治所送檢可疑豬瘟之病材，以MEM培養液(GIBCO)添加500U/ml盤尼西林，500 μ g/ml鏈黴素製成10倍乳劑供試驗用。

3. 紅血球吸附試驗：

將上述10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，接種於培養有Buffy coat之24孔培養盤，每孔接種0.2ml，每個病材最少接種4孔，並留4孔無接種病材者做為對照，接種後將24孔培養盤置於37 $^{\circ}$ C二氧化碳定溫箱培養，二氧化碳濃度為5%，培養24小時後開始以顯微鏡觀察，連續觀察6天。觀察有無紅血球吸附於白血球之情形。

直接免疫螢光(DIF)檢查

結 果

1. 冷凍切片豬瘟及豬假性狂犬病螢光標示抗體染色檢查：

扁桃腺、淋巴結、脾臟、肝臟等，以冷凍切片機切片成 5μ 之切片標本，室溫吹乾，於 -20°C 丙酮中固定10分鐘，以PBS清洗3次，乾燥。分別以豬瘟及豬假性狂犬病螢光標示抗體於保濕盒中在 37°C 下染色40分鐘，以PBS清洗3次，吹乾。滴一滴50%甘油PBS後蓋上蓋玻片，於螢光顯微鏡下觀察。

2. 細胞培養豬瘟及豬假性狂犬病螢光標示抗體染色檢查：

PK-15或CPK細胞製成細胞浮游液（1x MEM, 10%胎牛血清，100U/ml盤尼西林，100 μg /ml鏈黴素）其細胞數為 $4 \times 10^5/\text{ml}$ ，8孔chamber slide每孔加入0.2ml後，將十倍系列稀釋之病材乳劑每孔接種0.2ml，並留無接種病材者做為對照，接種後chamber slide置於 37°C 二氧化碳定溫箱培養，二氧化碳濃度為5%，培養24小時後開始以顯微鏡觀察，產生CPE時，如無CPE產生則於培養48-72小時，收集培養液除去塑膠盤壁，吹乾，以 -20°C 丙酮固定10分鐘後，進行螢光標示抗體染色。收集之培養液則進行二次繼代，如繼代三次仍未檢出病毒則丟棄之。

3. Buffy coat豬瘟DIF檢查：

已接種病材之Buffy coat，於培養2天後，以吸管吸取0.1ml，於cytopsin（英國S-handon公司出品）以1,000rpm離心5分鐘，標本吹乾後以 -20°C 丙酮固定10分鐘，繼以螢光標示抗體染色。

電子顯微鏡檢查

將病材乳劑及病材接種細胞培養液以高速離心後經負染色，免疫膠體金負染色，於電子顯微鏡下檢查病毒顆粒形狀。

由各縣市家畜疾病防治所蒐集之可疑病例131例，將其10倍病材乳劑接種於培養之Buffy coat，進行Had試驗結果，均無血球吸附現象出現。（圖1）

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，結果均未發現類似非洲豬瘟病毒顆粒之存在。診斷為豬假性狂犬病之病材可發現herpes virus（圖2）。診斷為豬瘟之病材以免疫膠體金負染色，可檢出豬瘟病毒顆粒（圖3）。

將所有病材以冷凍切片豬瘟及豬假性狂犬病螢光標示抗體染色，結果有12例可見豬瘟特異性螢光，有8例可見豬假性狂犬病螢光。

將病材乳劑做十倍系列稀釋，接種於已形成單層細胞之PK-15株化細胞，或CPK株化細胞、RK-13細胞與Buffy coat再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131例中有10例證明為豬瘟感染病例（圖4），11例為豬假性狂犬病（圖5、6）（表一）。

將2或3個豬瘟陽性病材乳劑混合後以及4或5個豬瘟陰性病材乳劑混合後，分別接種於已經豬瘟疫苗免疫之豬隻，觀察二週。結果均無任何症狀出現。但以相同病材乳劑接種於未經豬瘟疫苗免疫之試驗豬，結果顯示以豬瘟陽性病材乳劑接種豬呈現典型之豬瘟症狀，而3個豬瘟陰性病材乳劑接種豬則無呈現豬瘟症狀健存。

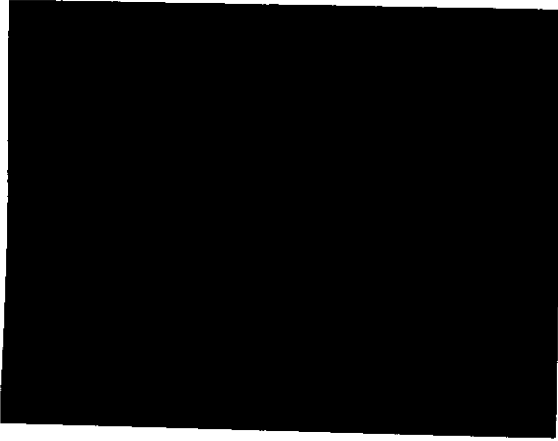


圖 1：以病材做紅血球吸附試驗，並無吸附紅血球之現象(400x)。

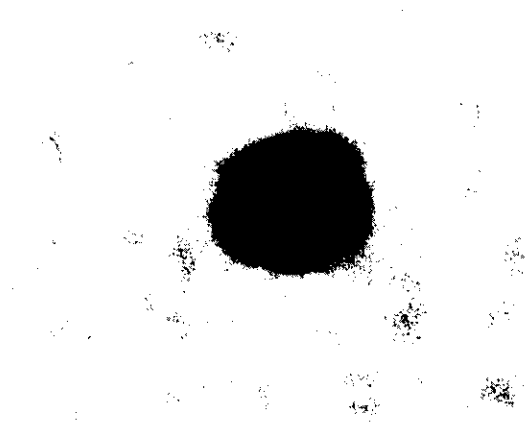


圖 2：診斷為豬假性狂犬病之病材以EM負染色可發現 herpes 病毒顆粒。bar=100nm

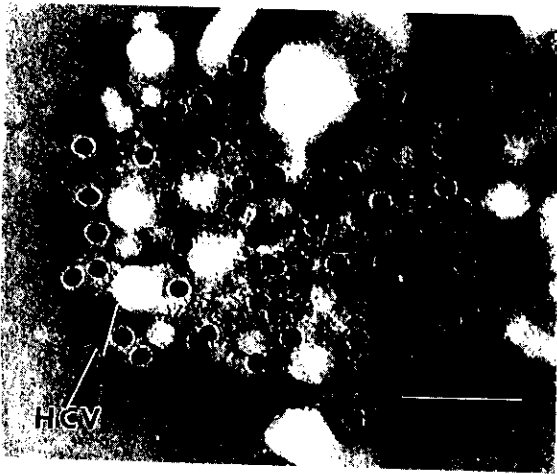


圖 3：診斷為豬瘟之病材以免疫膠體金負染色，可檢出豬瘟病毒顆粒 (HCV)。bar=100nm

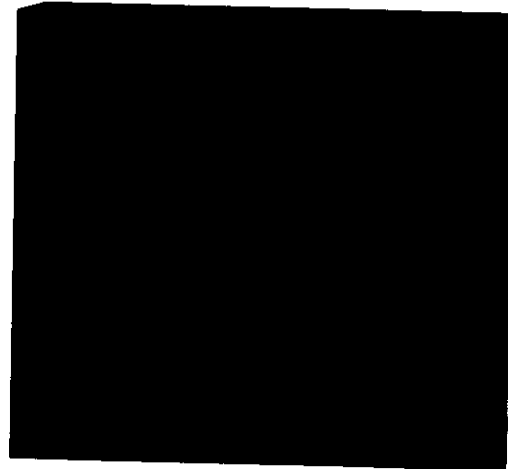


圖 4：CPK細胞接種豬瘟病材後，以豬瘟螢光標示抗體染色，於細胞質內染出特异性螢光(400x)。



圖5：CPK細胞接種豬假性狂犬病病材後，以豬假性狂犬病螢光標示抗體染出特異性螢光(400x)

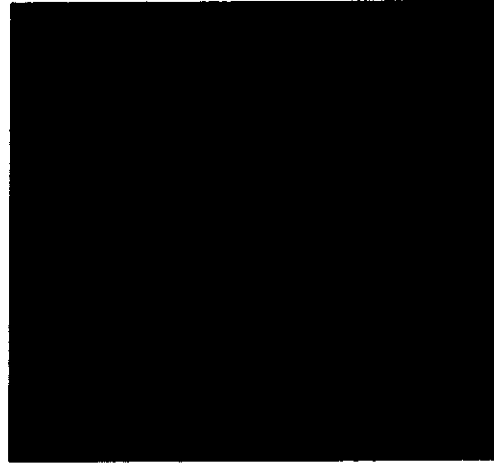


圖6：CPK細胞接種豬假性狂犬病病材後，產生CPE之情形(200x)。

表一 各地區可疑豬瘟及非洲豬瘟病例鑑別診斷之結果

	台北縣	桃園縣	苗栗縣	新竹縣	台中縣	彰化縣	台南縣	高雄縣	宜蘭縣	花蓮縣	台東縣	合計
病材數	15	3	41	17	3	10	8	3	23	4	4	131
豬瘟	1	3	1	1				1	3			10
豬假性病			3	1		3	1			1	2	11

討 論

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^(2,9,15)。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^(2,9,12,15)。
2. 血球吸附試驗^(8,9,10,15)。
3. 直接免疫螢光法^(7,15)。
4. 膠內沉降反應(AGDP)^(5,15)。
5. 補體組合試驗(CF)^(9,12)。
6. 放射性免疫試驗(RIA)^(4,14)。
7. 間接免疫螢光法(IIF)^(7,15)。
8. 免疫電泳法(IEOP)⁽¹⁴⁾。
9. 酵素連結免疫吸附試驗(ELISA)⁽⁶⁾。
10. 間接免疫過氧化酵素試驗(IIPS)⁽¹³⁾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^(8,9,10,15)。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131例病材中，有10例證明為豬瘟感染病例，11例為豬假性狂犬病。本試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證不是非洲豬瘟感染。綜合上述試驗結果顯示，受檢病材中並無非洲豬瘟之潛存。

由以上試驗之結果顯示本試驗中所用之診斷方法可供無非洲豬瘟診斷試劑時診斷非洲豬瘟之用。

有些豬假性狂犬病陽性病材需於細胞中繼代一代以上才能產生CPE或以螢光標示抗體染出，是因病毒量太少或是感染弱毒株之故，值得探討。冷凍切片螢光標示抗體染色檢出豬瘟陽性12例中之1例，後經接種培養細胞分離病毒結果，證明為豬假性狂犬病。

誌 謝

本試驗之完成承邱所長仕炎之鼓勵，本系許崇智先生幫助buffy coat之培養，呂蓮葉小姐在電子顯微鏡之協助謹致十二萬分之謝忱。

參考文獻

1. 林再春。1988。荷蘭發生與撲滅非洲豬瘟之始末。淡水鎮。台灣省家畜衛生該驗所印行。
2. 林榮培。1987。外來惡性家畜傳染病診斷手冊。台灣省政府農林廳印行。
3. Breese, S.S., Deboer, C.J. (1966) Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* 28, 420-428.
4. Crowther, J.R., Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1979) Solidphase radioimmunoassay techniques for the detection of ASF antigen and antibody. *J. Hyg. Camb.* 83, 353.
5. Coggins, L. and Heuschele, W.P. (1966) Use of agar diffusion precipitation test in the diagnosis of African swine fever. *Amer. J. Vet. Res.* 27, 486.
6. Handy, 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.

7. Heuschele, W.P., Coggins, L. and Stone, S.S. (1966) Fluorescent antibody studies on African swine fever. *Amer. J. Vet. Res.* 27, 477.
8. Hess, W.R. and DeTray, D.E. (1960) The use of leukocyte culture for diagnosing African swine fever (ASF). *Bull. Epiz. Dis. afr.* 8, 317.
9. Hess W.R. (1981) African swine fever : A Reassessment. *Advance in veterinary science and comparative medicine.* Vol.25, 39-69.
10. Malmquist, W.A. and Hay, D. (1963) Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Amer. J. Vet. Res.* 24, 450.
11. Moulton, J. and Coggins, L. (1968) Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet.* 58, 364.
12. Montgomery, R.E. (1921) On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Path.*, 34, 159 and 234.
13. Pan, I.C., Hung, T.S. and Hess, W.R.(1982) New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever. *J. Clin. Microbil.* 16:650-655.
14. Pan, I.C., De boer, C.J. and Hess, W.R.(1972) African swine fever: Application of immunoelectroosmophoresis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.* 36, 309.
15. Yechiel Becker.1987. *Development in veterinary virology : African swine fever.* Martinus Nijhoff Publishing, Boston.

Surveillance for Hog Cholera and African Swine Fever

Lin, Y.P^{1*}, Y.H. Yang¹, N.J. Li¹, C.H. Pan¹,
S.Y. Chern¹, H.T. Sung² and I.C. Pan²

1 Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
2 Council of Agriculture, Executive Yuan.

SUMMARAY

To survey the invasion of ASF, a total of 131 samples were collected. The testings include(1) PK-15 cells inoculations(2) FA test(3) leucocyte cultures(4) electron microscopic examinations(5) HC-immune pigs and susceptible controls inoculations. No ASF infection was detected in these samples. However, ten cases of hog cholera and 11 cases of pseudorabies were identified.

*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Hesth. Taiwan, R.O.C.