

# 台灣地區馬傳染性貧血症的抗體調查

楊揚輝 林文華 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

應用免疫擴散反應抗原調查台灣地區馬匹馬傳染性貧血症的感染情形。1990年經檢查本省15個縣市751匹之馬血清，計16匹是陽性，陽性率達2.1%。陽性例分佈於三個縣市，分別為高雄縣10.4%(8/77)，台北市4%(7/177)及苗栗縣2.9%(1/35)。

馬傳染性貧血症 (Equine infectious anemia, 簡稱EIA)，係由 Lentivirus 中之 Retrovirus 所引起<sup>(1,9)</sup>；是一種僅感染馬科動物的慢性傳染病<sup>(10)</sup>。自1843年首次發現後<sup>(6)</sup>，今已遍佈於世界各地有養馬的國家及地區。馬匹感染後，典型的臨床症狀是以間歇性的發熱為特徵，急性者會造成死亡，或演變成慢性及不顯性感染，成為終生持續保毒的帶原者，使其它健康的馬匹受到威脅<sup>(2,10)</sup>。本病主要是經由吸血昆蟲之媒介而散播<sup>(7,11)</sup>，至今尚無有效的預防及治療方法，但由於被感染後的馬會快速產生抗體，因此精確的測定血清中之馬傳染性貧血病毒的特異性抗體，就是分辨健康及不顯性感染馬匹的最好方法。目前普遍使用於EIA感染馬匹的血清學診斷方法，是根據 Coggins & Norcross 發展的瓊膠免疫擴散反應試驗法 (agar gel immunodiffusion test, AGID)<sup>(3)</sup>，這種診斷方法對於永存性感染之馬匹的EIA抗體測定，精確性可以達到95%，甚至於可以偵測出從未有臨床症狀出現的感染馬匹<sup>(4)</sup>。

本病在台灣過去尚無人進行調查研究，而且近來國內騎馬風氣漸盛，賽馬也可能開放，且養馬頭數亦日增，因此本試驗之主要目的是利用市售 AGID 抗原對全省馬匹做 EIA 抗體的調查，以了解 EIA 感染的情形，期能幫助建立馬匹防疫工作的基礎。

## 材料與方法

### 1. 血清來源：

自全省各縣市及台北市之公、私營馬場，不分品種共收集751個馬血清，供為調查之用。

### 2. 抗原與陽性對照血清：

試驗採用之市售品有：(A)馬傳染性貧血診斷用沉降反應抗原 (日本日生研株式會社，A抗原)。(B)馬傳染性貧血抗體測定盒 (equine infectious anemia antibody kit) (美國 Pitman-Moore Inc., Washington Crossing, B抗原)。其成品化過程大概如下：抗原是以馬傳染性貧血病毒持續感染的細胞株培養增殖後，收集其培

養液經不活化濃縮處理或經免疫親和性層析法純化後再經不活化處理之成品。陽性對照血清是以健康馬接種馬傳染性貧血病毒後所收集的4~8單位不活化標準血清。

### 3. 瓊膠平板的製作方法：

- (1) A瓊膠平板：取瓊膠 ( agar noble ) 0.8 gm，三氮化納 ( sodium azide ) 0.1 gm，加入 100 ml 0.85 % 生理食鹽水於煮沸水中使其溶解，充分溶解後的瓊膠取 4.5 ml 注加於事前以蒸餾水溶解之 1 % 瓊膠 ( agarose ) 溶液塗佈於乾燥的玻璃片 ( 26 × 76 mm ) 上待其凝固，使用於 A 抗原。
- (2) B瓊膠平板：取瓊膠 1 gm，加入於 100 ml 硼酸鹽緩衝溶液 ( NaOH 0.2 gm, H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 0.9 gm，蒸餾水 100 ml, pH 8.6 ) 內煮沸溶解後，再經 121 °C，15 磅壓力的高壓蒸氣滅菌七分鐘，待冷卻至 45 °C，取 18 ml 置入直徑十公分寬的培養皿內製成平板瓊脂凝膠層，使用於 B 抗原。

### 4. 免疫擴散法試驗：

凝固後的瓊膠平板，用打孔器打出由中央一個，周圍六個，共七個小孔的反應組。其每一小孔之直徑為 5 mm。各小孔距離為

3 mm。反應組中心孔加入 0.05 ml 抗原，周圍六個孔以間隔順序分別各加入對照血清及受檢血清 0.05 ml，最後將加入各檢體的瓊膠平板置於能保持濕度、溫度 ( 20 ~ 25 °C ) 的密閉容器內反應三天後判定。

### 5. 染色：

將反應後的瓊膠平板置於 2 % NaCl 溶液內透析二天，再換蒸餾水透析一小時，取出乾燥後，以 amido black 染色 1 分鐘，完成後，改加脫色液 ( 酒精 450 ml，醋酸 450 ml，蒸餾水 100 ml ) 直到瓊膠背景脫色呈透明為止。

## 結 果

### 1. 兩種抗原之特異性比較：

本次實驗應用 A 及 B 兩種抗原同時進行免疫擴散反應試驗檢驗 EIA 抗體，以抗原抗體反應有明顯的沉澱線者判為陽性，測試之後的結果顯示兩種抗原對於陽性例之驗出皆一致。而且也比較兩種抗原在互換瓊膠平板使用之下對 EIA 陽性例的測定，其結果也沒有差異，驗出率都相同 ( 如圖 1 )，但唯獨以 A 抗原檢驗時容易出現非特異性反應 ( 如圖 2 )。

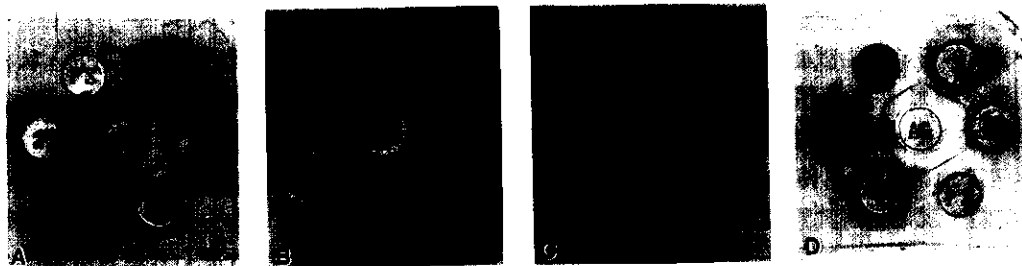


圖 1 A 及 B 抗原對 EIA 感染馬之抗體檢查

(A)：A 抗原對受檢馬血清之抗體測定

(B)：B 抗原對受檢馬血清之抗體測定

(C)：A 抗原使用於 B 瓊膠平板對受檢馬血清之抗體測定

(D)：B 抗原使用於 A 瓊膠平板對受檢馬血清之抗體測定

PS：陽性對照血清， AG：抗原

3, 20, 21, 25, 28, 36：受檢血清



圖2 兩種抗原對受檢馬血清檢驗之非特異性沉澱線比較

(A): A 抗 原

(B): B 抗 原

PS: 陽性對照血清, AG: 抗 原

15, 19, 26, 27, 33: 受檢血清

箭頭指示: 非特異性沉澱線

## 2. EIA 抗體陽性馬之分佈:

所檢驗馬 751 匹中, 有 16 匹是陽性, 陽性率達 2.1%。在三個有陽性病例發現的縣市, 以高雄縣的陽性率最高 10.4% (8/77), 台北市次之 4% (7/177), 苗栗縣最低 2.9% (1/35), 其餘各縣市均未有陽性檢出。

表1 台灣地區馬匹馬傳染性貧血症之抗體調查

縣市別	檢 查 匹 數	陽 性 匹 數	陽性率 (%)
台北市	177	7	4
台北縣	76	0	0
桃園縣	98	0	0
新竹縣	21	0	0
新竹市	30	0	0
苗栗縣	35	1	2.9
台中縣	83	0	0
台中市	16	0	0
南投縣	11	0	0
彰化縣	37	0	0
雲林縣	14	0	0
台南縣	44	0	0
高雄縣	77	8	10.4
屏東縣	27	0	0
花蓮縣	5	0	0
合 計	751	16	2.1

## 討 論

台灣地區以前由於養馬頭數並不多, 對於馬匹的衛生防疫工作未曾重視過, 但由於近年來養馬的風氣漸盛, 競馬可能開放, 馬匹數日亦日增且不惜從國外輸入優良血統之馬匹, 因而關於一些馬的傳染性疾病的檢測及防治更形重要。故本試驗首先針對馬的 EIA, 對全台灣地區 15 個縣市的馬匹作 EIA 抗體的調查, 也是首次以免疫擴散反應試驗發現台灣有 EIA 感染的馬匹。

經過本次的調查, 台灣地區馬匹總數雖然不多, 但陽性率竟然達 2.1%, 有台北市、苗栗縣、高雄縣三個縣市共 16 匹的馬受到 EIA 感染。此種情形對於日後發展養馬事業會有很大的影響, 因為: (1) 馬感染本病後會發生一種致命性的連續性高熱特徵, 並出現貧血<sup>(20,21)</sup>及可能伴隨其它臨床症候群 (肝腎症候群、胃腸症候群、心肌炎、腦膜炎等); (2) 不死耐過後即成爲無臨床症狀的病毒帶原者<sup>(2,10)</sup>, (3) 而且當病馬於發熱期間時, 毒血症會抵達最高峰<sup>(11,19)</sup>, 可以經由蚊、蠅等吸血昆媒叮咬<sup>(7,11,12,22)</sup>; 或污染血液的器具<sup>(23)</sup>、分泌物及排泄物<sup>(13,14)</sup> 等將病毒傳播給其它健康的馬匹, 造成嚴重的損害。又在早期時, 本病又稱爲沼熱 (Swamp fever), 是起源於這個疾病常

常發生於高溫潮濕之低海拔地區放牧的動物而命名<sup>(8)</sup>，台灣由於地處於亞熱地區，氣候潮濕而高溫，蚊蠅繁生，故本病之散播定會很迅速，因此對於抗體陽性馬應採取撲殺淘汰方式處理，以期根除本病。

本次實驗使用的市售品A及B兩種抗原，對於EIA感染的檢驗，顯示出B抗原比A抗原有較高的特異性。雖然得到的結果都是一致的，但是A抗原會產生非特異性的沉澱線，於判讀時易造成判定上的混亂及困惑，而B抗原均無非特異性沉澱線出現，因此建議日後對EIA抗體的檢驗，宜採用B抗原。

因為EIA是一種持續性感染的病毒性傳染病，其造成感染馬匹持續性毒血症的原理有四：(1)EIA病毒RNA反轉錄複製成互補DNA(cDNA)嵌入宿主細胞的基因中，維持潛性的感染或不表現出來，因而逃脫免疫系統的監視及破壞<sup>(18)</sup>。(2)急性的EIA病毒感染會造成巨大吞噬細胞的感染，而降低了巨大吞噬細胞的吞噬功能<sup>(16)</sup>。(3)免疫球蛋白雖直接作用於病毒表面的蛋白質，却不具中和能力，而其所形成的免疫複合物仍具有傳染性<sup>(17)</sup>。(4)因EIA病毒係由多群具不同抗原的病毒群所組成，對抗某一群病毒所產生的抗體祇能中和該群病毒，而不能中和其它群的病毒<sup>(15)</sup>。因此本病至目前為止尚無有效的預防及治療方法，但是以切斷散播源來預防更進一步的傳播，是能夠控制這個疾病的，甚至或許可以將其根除，在香港地區，使用免疫擴散反應試驗檢驗所有馬群，並將感染的馬匹作安樂死，已經證明能夠將本病根除<sup>(5)</sup>。

## 誌 謝

本報告得以完成承蒙農委會79農建-4.3-牧-52計畫經費提供及運林廳支持；全省各縣市家畜疾病防治所第三股及台北市家畜衛生檢驗所第二課人員協助特予感謝，試驗進行又承國科會聘請回國之前美國農業部獸醫官，客座專家潘英章博士指導及本所疫學系呂榮修主任提供(田)抗原作比較試驗，在此謹致以謝忱。

## 參 考 文 獻

1. Charman HP, Bladen S, Gilden RV et al: Equine infectious anemia virus: Evidence favoring classification as a retronavirus. *J. Virol* 19: 1037-1079, 1976.
2. Cheevers WP, McGuire TC: Equine infectious anemia virus: Immunopathogenesis and persistence. *Rev Infect Dis* 7: 83-88. 1985.
3. Coggins L, Norcross NL: immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet* 60:330-335, 1970.
4. Coggins L, Norcross NL, Nusbaum SR: Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am J Vet Res* 33: 11-18, 1972.
5. Coggins L, Auchincloss JA: Control of equine infectious anemia in horses in Hong Kong. *J Am Vet Med Assoc* 170: 1299-1301. 1977.
6. Dreguss MN, Lombard LS: Experimental studies in equine infectious anemia. Philadelphia, University of Pennsylvania Press. 1954
7. Foil LD, Meek CL, Adams WV et al: Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am J Vet Res* 44: 155-156. 1983.
8. Gillespie JH, Timoney JF: Equine infectious anemia. In: Gillespie JH, Timoney JF, ed. *Hagan and Bruner's infectious Diseases of Domestic Animals*, 7th ed. University Book Publishing Company, Taipei, Taiwan, R.O.C. 797-803, 1982.
9. Gonda MA, Charman HP, Waker JL et al: Scanning and transmission electron microscopic study of

- equine infectious anemia virus. *Am J Vet Res* 39:731-740, 1978.
10. Ishii S: Equine infectious anemia: Current Knowledge. *J Am Vet Med Assoc* 174: 727-733, 1979.
  11. Issel CJ, Foil LD: Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J Am Vet Med Assoc* 184: 293-297, 1984.
  12. Japanese Commission. Horse Administration Bureau. Tokyo. Reports on the results obtained by the special committee for investigation of equine infectious anemia of the horse. *Vet J* 70: 604-627, 1914.
  13. Kemen MJ Jr. Coggins L: Equine infectious anemia: transmission from infected mares to foals. *J Am Med Assoc* 161: 496-499, 1972
  14. Kono Y, Fukunaga Y, Kusunaga Y. Kobayashi K: Excretion of equine infectious anemia virus from horses infected with the virus. *Matl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 13: 182-186, 1973.
  15. Kono Y. Kobayashi K. Fukunaga Y: Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. *Archiv fur die Gesamte Virusforschung* 41: 1-10, 1973.
  16. McGuire TC, Crawford TB, Henson JB: Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am J Pathol* 62: 283-292, 1971.
  17. McGuire TC, Crawford TB, Henson  
Equine infectious anemia: Detection of infectious virus-antibody complexes in the serum. *Immunol Commun* 1: 545-551, 1972.
  18. Rice NR, Simek S, Ryder OA et al: Detection of proviral DNA in horse cells infected with equine infectious anemia virus. *J Virol* 26: 577-583, 1978.
  19. Salinovich O, Payne SL, Montelaro RC et al: Rapid emergence of novel antigenic and genetic variant of equine infectious anemia virus during persistent infection. *J Virol* 57: 71-8-, 1986.
  20. Sentsui H, Kono Y: Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus. *Arch Virol* 95: 53-66, 1987.
  21. Sentsui H. Kono Y: Phagocytosis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus by cultivated horse leukocytes. *Arch Virol* 95: 67-77, 1987.
  22. Tashjian R: Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period, *J Am Vet Med Assoc* 184: 282-288, 1984.
  23. Williams DL, Issel CJ et al: Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am J Vet Res* 42: 1469-1473, 1981.

## Detection of Equine Infectious Anemia Antibody in Horse Serum in Taiwan

Y.H. Yang, W.H. Lin and S.Y. Chiu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

### SUMMARY

A serological survey of equine infectious anemia (EIA) in horses in Taiwan was performed using the commercial antigen by the agar gel immunodiffusion test. of 751 serum samples collected from 15 geographical areas in 1990. 16 horses ( 2.1% ) were positive for EIA antibody. These EIA-positive horses were raised in 3 geographical areas. The positive rates of EIA-infected horse in Kaohsiung, Taipei and Miaoli were 10.4%(8/77), 4%(7/177) and 2.9%(1/35), respectively.