

臺灣豬腸道病毒之分離及抗體調查

呂榮修¹ 蔡義雄² 鍾明華¹ 劉培柏¹
李永林¹ 楊喜吟¹ 王金和¹ 王吉德³

1975年11月，在桃園縣發生神經症狀之一頭病豬，1976年2月，由北港從多數死亡，腦有淋巴球圍管現象的病豬4頭以及1976年8月，在高雄縣由嚴重下痢的哺乳病豬1頭之腦、脾及腸道共分離6株病毒。所分離之6株病毒在初代豬腎細胞之第1代接種不會引起CPE，至第3代繼代以後，才引起明顯的圓形化CPE及形成小型之斑點(Plaque)。從6株分離毒株之性狀研判，分離之病毒在本省尚未分離報告之豬腸道病毒，其CPE型態屬於I型。從血清學分類，6株分離毒與日本之10種標準血清作血清學型別，6株均歸納為J5型(與WHO/FAO的6型相符)。經本型的抗體調查，在本省8縣豬羣均有本血清型之病毒中和抗體，10倍以上者占97.7%。

Treffny⁽²⁰⁾於1929年在捷克的鐵縣(Teschen)最初發現由豬腸道病毒所引起的灰白腦脊髓炎，然後以神經症狀為主的本病迅即蔓延至歐洲各國。但1950年，在丹麥、英國、瑞典、加拿大、美國等所發生的豬灰白腦脊髓炎的病情比鐵縣病(Teschen disease)輕，且為散發性的。因此，由Thordal-christonson研究並於1959年報告稱為豬良性地方性輕性麻痺症(benign enzootic paresis of pig)等病名。本病毒除了會引起神經障害以外，也會引起消化器疾病⁽¹¹⁾，呼吸器感染⁽¹⁶⁾，胎兒感染⁽⁷⁾。此外本病毒能自心肌炎，健康豬的糞便，鼻腔分離。

筆者等於1975年以來，從神經症狀病例，小豬多數死亡病例以及下痢等病例分離腸道病毒，茲將發生病例之病毒分離、性狀及抗體調查等成績報告於後供為參考。

材料與方法

野外病例：1975年11月，桃園病例1頭；1976年2月，北港病例5頭；1976年8月，永安病例2頭病豬供為試驗。

組織病理檢查：取病豬之腦，固定於10%中性福馬林中，經石臘包埋切成6 μ 厚度，以蘇木紫及伊紅染色後鏡檢。

病毒分離：桃園病例採大腦；北港病例No. 6249

70年3月11日

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 台灣省政府農林廳畜牧科衛生股
3. 國立中興大學獸醫學系

，採腦、肺，No. 6285之腦、淋巴節，No. 5683之腦、肺、脾，No. 6582及No. 5916之腦、脾；永安病例之腦、肺、脾、淋巴節、空腸等臟器製備10倍乳劑後，接種於初代豬腎(SK)細胞，並連續繼代該細胞3代觀察CPE，同時以無接種病材之該細胞為對照。

細菌檢查：使用Trypticase soy agar及Blood agar對上述分離病毒材料以好氣性及厭氣性培養法培養細菌。

血清型別：標準血清使用日本農林水產省家畜衛生試驗場之J1~J10等10種血清型，血清原液0.2 ml加100 TCID₅₀之病毒液0.1 ml，在37°C感作1小時後，取該病毒血清混合液0.1 ml，接種於小試管(1×10cm)培養已形成單層細胞之初代SK細胞各4支，各另置2支為無接種病毒及單一病毒接種之對照。

抗體調查：被檢血清收集8縣屠宰場之肉豬血清，分別有宜蘭縣120頭，臺北縣7頭，臺中縣56頭，南投縣81頭，彰化縣103頭，澎湖縣50頭，臺南縣84頭，屏東縣70頭，共571例血清供以中和試驗。

中和試驗使用ESK細胞做微量血清中和試驗，在微量盤(microtray)上，血清以10倍稀釋後再以2倍階段稀釋至640倍，稀釋後血清之0.025 ml加同量之200 TCID₅₀之5683株(10^{6.0} TCID₅₀/ml)病毒液，混合後在室溫感作一小時，然後取病毒血清混合液0.025 ml於已加ESK浮游液0.025 ml之盤上培養，觀察7日如有1孔

表 1 北港病例之病猪死亡情形

種 猪 No.	生 產 期 間	生 產 頭 數		死 亡 頭 數 (%)		計 (%)
		累 計		保 育 小 猪	保 育 外 小 猪	
1,032	1975 11	888				
	1975 12	669				
			3,586	570	244	814
	1976 1	989		(15.9)	(6.8)	(22.7)
	1976 2	1040				

表 2 北港分離例之臨床及病理所見

小 猪 No.	臨 床			肉 眼 病 理 出 血 性 病 變							
	體 溫 (°C)	下 痢	黃 疸	脾 腫	腎	淋 巴 結	消 化 道	扁 桃 腺	膀 胱	皮 膚	
6249	40.0	卅	—	+	+	+	—	—	+	卅	
6285	39.5	卅	—	—	+	—	—	—	—	卅	
5683	38.5	—	+	卅	+	+	+	+	+	—	
6582	39.3	—	—	—	+	+	—	—	—	卅	
5916	39.6	—	—	—	—	+	—	—	—	—	

註：+：輕度病變

卅：高度病變

阻止 CPE 出現的血清稀釋倍數為抗體價。

結 果

一、野外病例發生概況

桃園病例：據稟告該病猪在種猪檢定中心發現有神經症狀之僅 1 頭病例。

北港病例：1975年11月~1976年2月間，在雲林縣四湖種猪場所生產之3568頭小猪，在保育中（28~56日齡）發病致死或淘汰 570頭（15.9%），另保育外小猪（大於56日齡）發病或淘汰 244 頭（6.8%），共 814 頭（22.7%）損失。其生產發病情形如表 1 所示。

永安病例：高雄縣某養猪場於1976年8月，發生哺乳小猪的嚴重下痢病例。

二、北港病例之臨床狀及病理變化

病猪發熱通常在 40°C 以上，有時高達 41.5°C，表 2 中經撲殺例僅 No. 6249 為 40°C，其餘 4 例在 38.5~39.6°C，病猪耳部，後股及下腹部出現紫斑、紅斑。眼結膜潮紅或紅腫，眼屎、眼臉癒着，外陰部腫脹，No. 5683 皮膚呈黃疸，至末期發

生下痢（臭蛋味）消瘦。

肉眼病理變化分佈於全身大部分淋巴如耳下、顎下、鼠蹊、胃門、腸繫膜等淋巴腫脹，高度出血。病例 No. 5683 之喉頭、食道、扁桃腺、小腸均見出血性變化，膀胱出血（No. 6249、5638）。大部分病例之腎均有出血性變化，成績如表 2。病例 No. 5683 及 6582 併發肺炎。切片於大腦半球、小腦、小腦腳及延髓見大量淋巴球圍管，甚多圓核細胞浸潤於腦血管週圍，且多偏在 V. R. 空間之一邊（圖 1），亦可見神經膠細胞增生小結節。

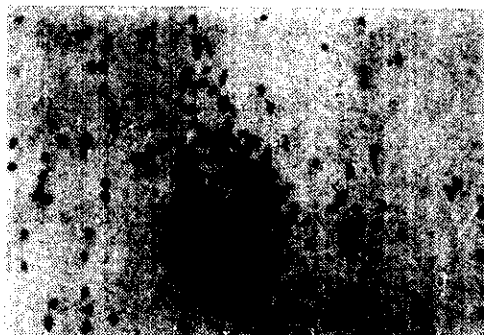


圖 1 腦切片所見之淋巴球圍管現象，HE 染色

三、北港病例之臨床病理

經血液檢查，病豬白血球、血球容積比、白血球層均有減少、呈貧血、又尿中出現上皮細胞、白血球等細胞顯示腎機能有損害，其餘檢查項目均為正常如表 3 所示。

四、病毒分離

由桃園病例及北港病例之 No. 6249、6285、5683 及 5916 等腦乳劑，No. 6582 之脾以及永安

病例之腸內容等乳劑，經接種於初代 SK 細胞，結果第一代細胞並無變性，至第 2 代後部分細胞開始變性為圓形但不甚明顯，及至 3~4 代繼代後細胞個個成為圓形化簇集如葡萄房狀之 CPE。分離毒在初代 SK 細胞能形成斑點 (Plaque)。5816 株對 SK 細胞之感染價有 $10^{7.2}$ PFU/ml，又北港病例之豬瘟病毒檢查均為陰性，成績示於表 4。

五、分離毒之病毒性病

表 3 北港病例之血液及尿檢查

項 目		病 例 No.				
		6249	6285	5683	6582	5916
血液 學 檢 查	血 精	<45	<45	<45	<45	<45
	血 中 尿 素 氮	10	15	20	10	15
	紅血球沉降速率	Normal	Normal	abnormal	Normal	Normal
	白 血 球	$7.4 \times 10^3/mm^3$	$7.5 \times 10^3/mm^3$	ND	ND	$7.8 \times 10^3/mm^3$
	血 球 容 積 比	2.1%	2.1%	<15%	39%	21%
	白 血 球 層	0.1%	0.1%	0.1%	0.8%	0.1%
	黃 疸 指 數	5	5	5	5	5
尿 液 學 檢 查	酸 鹼 度	6	6	6	6	ND
	蛋 白 質	<100 mg/dl	trace	teace	trace	ND
	葡 萄 糖	—	—	—	—	ND
	酮 體	—	—	—	—	ND
	潛 血	—	—	—	—	ND
	尿 膽 素 元	—	0.1 Ehrlich/100ml	0.1	0.1	ND
	尿 膽 紅 素	—	—	—	—	ND
查	細胞學檢查	Sg. cell+ Cub. cell+	Sg. cell## Cub. cell## WBC #	—	—	ND

表 4 本省各野外病例分離豬腸道病毒與豬瘟病毒之證明

病猪 No.	腦		肺		脾		淋 巴 節		空 腸	備 考
	EV	HCV	EV	HCV	EV	HCV	EV	HCV		
桃 園	+	—								神經症狀 腦炎症狀 敗血症 " " " "
6249	+	—	—	—						
6285	+	—					—	—		
5683	+	—	—	—	—	—				
6582	—	—			+	—				
5916	+	—			—	—				
永 安	—		—		—		—		+	下 痢

註 HCV: Hog cholera virus

E V: Entero virus

空欄: 無做

表 5 分離病毒之物理化學性狀

毒 株	處理前	20% Ethyl ether	0.1% SDC	0.25% Trypsin	D.W. 50°C 30'	1M/MgCl ₂ 50°C30'	PH	
							8.0	9.0
5916 ⁽¹⁾	7.2	7.6	7.5	6.1	6.6	6.0	3.6	7.2
永光 ⁽²⁾	6.5	0	0	4.2	3.7	1.4	0	5.2
香港 ⁽³⁾	7.5	7.8	7.5	7.7	4.7	7.3	6.4	7.5

(1): 分離病毒。

(2): 假性狂犬病病毒。

(3): 水泡病病毒。

表 6 各分離毒株對豬腸道病毒標準血清中和試驗

毒 株 No.	標 準 血 清											對照
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10*		
3582	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5683	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5916	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6249	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
桃園	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
永安	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

註一: 不中和

+: 中和

※: JW47

表 7 北港5683株對本省8縣屠宰場肉豬中和抗體調查

縣 名	檢查頭數	中 和 抗 體 價							
		<10*	10	20	40	80	160	320	≥640
宜 蘭	120	9	18	24	13	25	12	5	14
臺 北	7								7
南 投	81				9	8	10	7	47
臺 中	56			7	10	7	9	7	16
彰 化	103				7	17	8	14	57
臺 南	84	2	3	2	12	16	17	11	21
屏 東	70		1	7	5	16	12	10	19
澎 湖	50	2	4	10	0	9	5	4	7
計	8 571	13	26	50	65	98	73	58	188
百分比(%)		(2.3)	(4.6)	(8.8)	(11.4)	(17.6)	(14)	(10.2)	(33)

註: ※血清稀釋倍數。

如表 5 所示，分離毒 5916 株對 Ethyl ether, 0.1% SDC, 0.25% Trypsin 具有抵抗性，病毒在 1M/MgCl₂ 溶液保護下在 50°C 30 分鐘處理，頗為穩定，對蒸餾水 50°C 30 分鐘之處理亦具抗性。本病毒對 pH 3.0 (在室溫 3 小時處理) 有 50% 病毒被不活化，pH 9.0 即病毒感染價不變。

所有分離毒對雞紅血球並無凝集性。

六、細菌分離

由 3 個病例做細菌分離結果均為陰性。

七、分離毒之血清學分類

在本省由 3 個病例所分離之 6 株腸道病毒與日本腸道病毒之 J1~J10 標準血清做中和試驗，結果所有分離毒株僅與 J5 標準血清中和，亦即歸類於 WHO/FAO 6 型血清型，成績如表 6。

八、本省各地豬腸道病毒之抗體調查

從宜蘭、臺北、南投、臺中、彰化、臺南、屏東、澎湖等 8 縣屠宰場收集之 571 例血清，以微量滴定法做血清中和試驗結果，中和抗體價在 10 倍以下 13/571 (2.3%)，具有 10 倍者 26/571 (4.6%)，20 倍 50/571 (8.8%)，40 倍 65/571 (11.4%)，80 倍 98/571 (17.6%)，160 倍 73/571 (13%)，320 倍 58/571 (10.2%)，640 倍 188/571 (33%)，抗體價頗高且遍及所有檢查之縣份，表 7。

討 論

在臺灣由豬腸道病毒所引起的豬病不甚明瞭，且無病毒分離之報告。筆者等在 1975 年 11 月，1976 年 2 月，8 月由 3 個病例陸續分離到豬腸道病毒，而證實為豬腸道病毒所引起的疾病在臺灣發生。一般豬腸道病毒引起的代表性症狀為灰白腦脊髓炎，其致死率可達 70~90%。而 1975 年 11 月，由病豬分離之桃園病例僅 1 頭發生神經症狀；而 1975~1976 年發生疾病而分離病毒之北港病例，其死亡淘汰率達 22.7%，但在臨床上並無顯著的癱瘓等神經症狀，與 Treffny⁽²⁰⁾ 報告之鐵縣病，在病毒的原原性上截然不同。Gois⁽¹⁹⁾ 報告本病毒對腸道組織具有親和性，較易由各腸道、扁桃腺、鼻腔、肺、橫隔膜、肝及腸繫淋巴分離到病毒，但從腦、脊髓、脾及腎較難分離⁽¹²⁾，筆者對桃園及北港 2 個病例，從腦 (3/5) 及脾 (1/5) 分離到病毒，而北港病例，腦經切牛鏡檢示非化膿性腦炎，豬瘟病毒之分離螢光抗體檢查為陰性，因此北港病例與腸道病毒

之感染頗有關連；而桃園病例似為偶發病例。至於本病毒之感染來源及其途徑頗難以查明。

據許多報告，腸道病毒可引起小豬下痢^(7,11,17)，永安病例本懷疑 TGE 而送之本所，對疫情並無深入調查。至於仔豬下痢原因甚多，今後應廣泛調查病因，或許腸道病毒、輪狀病毒等，在臺灣將繼續被分離或發現。

Betts 等⁽⁴⁾ 提倡豬腸道病毒應具備下列 4 個條件：(1) 病毒之大小約為 30 nm，(2) 對 Ethyl ether 具有抵抗性，(3) 能在豬消化道增殖，(4) 會在 SK 細胞引起 CPE。筆者等所分離之 6 株均能引起 SK 細胞病變，但繼續至 3 代以後，才呈現明顯之圓形化 CPE 及小型斑點，豬腸道病毒對 SK 細胞可產生兩種不同型態之 CPE^(4,14,15,18,19) 及大小不同之斑點，此次分離 6 株之病毒依其 CPE 型態及小斑點應屬於 I 型。

分離毒對 Ethyl ether 具有耐性與 Betts 等⁽⁴⁾ 及守本⁽¹⁵⁾ 等成績相符，又對 Trypsin 及膽汁酸鹽 (SDC) 亦具有抵抗性，此與 Morimoto⁽⁵⁾ 之成績一致。5916 株對蒸餾水或含有 1M 之氯化鎂溶液在 50°C 30 分鐘之處理均具有抵抗性，此亦與 Wallis and Melnick⁽²¹⁾ 以及 Yamanoichi⁽²²⁾ 等成績相吻合，由以上成績分離毒具有豬腸道病毒之性狀。

豬腸道病毒有不同的血清型，Dunne⁽⁸⁾ 等以 5% 之中和力價為基礎而分類 8 種血清型。在日本守本⁽²⁾ 也分類在日本分離之病毒血清型為 J1~J7。

在臺灣分離之 6 株病毒與日本之血清型 J1~J10 做血清學分類，結果分離毒 6 株均與 J5 中和，據守本⁽¹⁾ 之報告 J5 為 CPE 型態 I 型，與 WHO/FAO 6 型之抗原性相同⁽²⁾。一般會形成 I 型 CPE 的病毒如 Teschen, T80, ECPO6 等，可引起 HPCD 豬 (Hystorectomy-produced, colostrum-deprived pig) 或 CD 豬 (Colostrum-deprived pig) 之灰白腦脊髓炎，形成 II 型 CPE 的 V13, MF, ECPO5，則病原性較低，若有病原性，亦僅引起輕度的非化膿性腦炎而已^(10,22)。在臺灣所分離之 J5 型 (WHO/FAO 6 型) 血清型病毒對豬之病原性尚未檢討，本病毒是否會引起灰白腦脊髓炎及下痢，今後尚須進一步探討。

對本省 8 縣市抗體調查，10 倍以下者僅 2.3%，且 640 倍之高力價達 33%，並普及所有檢查之 8

縣各養豬場，由此可見本血清型之病毒已在本省污染甚廣，值得防疫上之重視。

誌 謝

本研究承蒙日本農林水產省家畜衛生試驗場製劑研究部豬瘟研究室室長清水悠紀臣博士協助分離毒之血清學型別及豬瘟病毒之證明謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. 守本富昭 1971 豚のエンテロウイルスとその感染家畜衛生研究報告 62:25-39
2. 守本富昭 1977 豚エンテロウイルス感染症 豚病学 (熊谷哲夫、波岡茂郎、丹羽太左衛門、笹原二郎編集) 267-274. 近代出版, 東京
3. Beran, G. W., A. A. Werder and H. A. Wenner, 1958 Enteroviruses of swine. I. Their recognition, identification, and distribution in a herd of swine. *Amer. J. Vet. Res.* 19:545-553
4. Betts, A. O., D. F. Kelly, P. H. Lamont, and B. E. Sheffy, 1961 The isolation and characterisation of some enteroviruses from pigs. *Vet. Rec.* 73:752-755
5. Bohl, E. H., K. V. Singh, B. B. Hancock, and L. Kasza, 1960 Studies on five porcine enteroviruses. *Amer. J. Vet. Res.* 21:99-103
6. Cartwright, S. F., C. N. Hebert, R. A. Huck and A. B. Paterson, 1963 Enterovirus neutralizing antibodies in the sera of normal pigs in S. E. England. II. The incidence and distribution of sera from normal pigs containing neutralizing antibodies to Taifan, Teschen (Konratice), T 80, T 52A, and V 13 viruses. *Res. Vet. Sci.* 4:1-10
7. Dunne, H. W., J. L. Gobble, J. F. Hokanson, D. C. Kradel and G. R. Bubash, 1965 Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. *Amer. J. Vet. Res.* 27:1284-1297
8. Dunne, H. W., J. T. Wang, and E. Ammerman, 1971 Classification of North American porcine enteroviruses: A comparison with European and Japanese strains. *Infect. Immunol.* 4:619
9. Gois, M., 1971 Personal communication.
10. Hancock, B. B., E. H. Bohl, and J. M. Birkeland, 1959 Swine Kidney cell culture susceptibility to viruses and use in isolation of enteric viruses of swine. *Amer. J. Vet. Res.* 20:127-132
11. Izawa, H., R. A. Bankowski, and J. A. Howarth, 1962 Porcine enteroviruses. I. Properties of three isolates from swine with diarrhea and one from apparently normal swine. *Amer. J. Vet. Res.* 23:1131-1141
12. Kasza, L., J. Holman, and A. Koestner, 1967 Swine polioencephalomyelitis virus in germfree pigs. Viral isolation, immunoreaction, and serum electrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 28:461
13. Konishi, S. and R. A. Bankowski, 1968 Effect of high levels of carbon dioxide on pigs infected with porcine enterovirus. *Japan. J. Vet. Sci.* 30:131
14. L'Ecuyer, C. and A. S. Greig, 1966 Serological and biological studies on porcine enteroviruses isolated in Canada. *Canad. Vet. J.* 7:148-154
15. Morimoto, T., G. Tokuda, T. Omori, K. Fukusho, and M. Watanabe, 1962 Cytopathogenic agents isolated from the faeces and the intestinal content of pigs. I. Their isolation and serological classification. II. Properties of the isolates. *Natl. Inst. Animal Health Quart. (Tokyo)* 2-59, 66. *Abstr. Vet. Bull.* 33:25
16. Meyer, R. C., G. T. Woods, and J. Simon, 1966 Pneumonitis in an enterovirus infection in swine. *J. Comp. Pathol.* 76:397
17. Moscovici, C., 1959 Isolation of a cytopathogenic agent from swine with enteritis. *Am. J. Vet. Res.* 20:625
18. Singh, K. V., E. H. Bohl, and V. L. Sanger, 1964 Encephalomyelitis of pigs produced experimentally by a porcine enterovirus. *Cornell Vet.* 54:612-628
19. Switzer, W. P. and C. L'Ecuyer, 1960 Detection of swine nasal viruses in cell cultures. *Amer. J. Vet. Res.* 21:967-970
20. Treffny, L., 1930 Massenerkrankungen von Schweinen in Teschener Land. *Zverolek. Obzor* 23:235-236
21. Wallis, C. and J. L. Melnick, 1962 Cationic stabilization--A new property of enteroviruses. *Virology* 16:504-506
22. Yamanouchi, K., R. A. Bankowski, and J. A. Howarth, 1964 Pathogenicity of E 1 and E 4 strains of porcine enteroviruses in specific pathogen-free pigs. *J. Infect. Dis.* 114:450-457
23. Yamanouchi, K., R. A. Bankowski, and J. A. Howarth, 1965 Physical and biological properties of the Chico strain of porcine enterovirus. *J. Infect. Dis.* 115:345-355

VIRUS ISOLATION AND ANTIBODY SURVEY ON SWINE ENTEROVIRUS IN TAIWAN

Y. S. Lu¹, I. S. Tsai², M. H. Jong¹, P. P. Liu¹, Y. L. Lee¹,
S. Y. Yang¹, C. H. Wang¹ and J. T. Wang³

Six strains of virus were isolated from brain, spleen, or intestine of pigs in 3 outbreak cases i. e. pigs with nervous symptom at Taoyung in Nov. 1975; pigs with perivascular lymphocytic cuffing in brain at Peikung in Feb. 1976 and nursing piglets with severe diarrhea at Kaoh-sung in Aug. 1976. The isolates did not show any cytopathic effect (CPE) in primary pig kidney cultures but showed rounding changes with small plaques in the cultures after 3 passages. The results of physiochemical characters of the isolates indicated that they belonged to swine enterovirus. Morphological observation revealed that they caused type I CPE, however, serological tests, as compared with 10 kinds of standard antisera derived from Japan, all six isolates belonged to serotype J5 (WHO/FAO serotype 6). Sera collected from farms were subjected to neutralization tests, and 97.7% of them had antibody level of 1:10 or higher.

-
1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
 2. Dept. of Forestry and Agriculture Taiwan Provincial Government.
 3. National Chung Shing University.