

# 猪水疱病急速診斷法之研究

賴秀穗 何維莊 黃天祥 萬小坤

## 緒 言

猪水疱病係由腸內病毒所引起 (8,9) 其臨床症狀與口蹄疫無法區別。於 1966 年最初在意大利發現 (8)，相繼則於香港 (7)，英國 (4) 發生，其病原經血清學鑑定與最初在意大利分離者相似。後來本病不斷在歐洲 (1,6) 及亞洲 (10) 發生。

布朗等 (3) 應用免疫擴散法可區別猪水疱病毒與柯沙奇 B5 (Coxsackievirus B5) 型病毒之感染。應用螢光標示抗體法檢出組織培養細胞內之猪水疱病抗原亦已被報告 (5)。

本試驗之目的在探求猪水疱病之急速診斷法，以便應用於與口蹄疫之區別診斷。

## 試驗材料及方法

抗原：猪水疱病病毒 (由美國梅島動物疾病研究中心引進，經初代猪腎細胞繼代 25 代) 大量增殖於初代猪腎細胞，當感染猪腎細胞全部呈細胞病變時收集細胞感染液，並經 12,000g 15 分鐘離心，其上清液加入 8% 之 Polyethylene glycol (PEG) 在攝氏 4 度攪拌 3 小時，其混濁液再經 12,000g 30 分鐘遠心，其沈澱物再以其原有體積之百分之一之 Tris-buffered saline (TBS, 0.15M NaCl, 0.02M Tris-HCl, PH7.5) 溶解之，並加 0.1% Sodium azide, 儲存於零下 70 度供用。

血清：由野外任意採取之猪血清經攝氏 56 度 30 分鐘非鹼化處理後保存於零下 20 度冰箱。

免疫擴散法：以 0.01M PBS 泡成 0.65% 之 agarose 另加 0.15M NaCl 及 0.05% Sodium azide, 經蒸汽滅菌 (15 磅 20 分) 後，待冷至攝氏 45 度左右分裝於平皿 (每一平皿約為 16ml)，置於平板上使凝固後儲存於普通冰箱內。用時以不銹鋼打洞器切割平皿後以真空幫浦除去瓊脂。中間洞加入 20ml 之猪水疱病抗原，周圍洞內各加 20ml 之被檢血清，置於室溫有水氣之密閉盒內，24—48 小時後判定之，介於抗原及被檢血清中如有一條白色沈澱線則為陽性，其線模糊者判為疑陽性，無線者為陰性。

血清中和試驗：血清中和試驗係以修定之微量測定法 (Modified microtiter method) 行之，即在試管內 2 倍稀釋被檢血清後與等量含有 100TCID<sub>50</sub> 之猪水疱病病毒液混合，置 37 度暖房 1 小時中和感染作後，將各稀釋階段之血清一病毒混合液以 1ml 之吸管病滴 1 滴於塑膠板之洞內 (每一稀釋階段用 2 洞) 並隨即加入 0.2ml 之 PK-15 細胞液，然後以膠帶密封，置 37 度培養，72 小時後判定並以 Kärber 法計算其血清中和力價。

猪水疱病免疫血清之製造：三個月齡之 SPF 猪分別以靜脈及皮下注射猪水疱病毒 1ml 及 0.5ml (10<sup>7.5</sup>PFU/ml) 注射後於第三天呈典型之猪水疱病，於第三週後恢復，放血，分離血清，其中和力價高於 3.5log。

螢光標示抗體液之製造及其染色方法：螢光標示抗體液之製造及其染色方法依林等所報告之方法 (1)。

## 試驗結果

131 頭猪血清以免疫擴散法與中和試驗法分別測定其所含之猪水疱病抗體，其結果如表所示，其中 20 頭血清之中和力價等於或低於 4 倍者，以免疫擴散方法測定均為陰性，而血清中和力價等於或高

於128倍之36頭血清則均為陽性，以免疫擴散法測定131頭血清中10頭為疑陽性佔7.63%。圖一指出以免疫擴散法檢出豬水疱病抗體之情形。

本試驗所製之螢光標示抗體液，特異性高，染色力價達8倍，可應用於冷凍切片及組織培養方法之診斷。豬水疱病毒感染之細胞經染色後於細胞質呈現黃綠色之特異螢光。圖二及圖三分別表示感染豬水疱病之扁桃腺及冠狀帶皮膚組織出現黃綠色之特異螢光。

## 討 論

從試驗結果明顯地得知，免疫擴散法及血清中和試驗檢出豬水疱病抗體關係至為密切，特異性高，前者顯然比後者之敏感度低，但如抗體力價增高則二者之檢出率趨向一致。而以免疫擴散法較為簡便迅速，但其缺點祇能定性而不可定量。

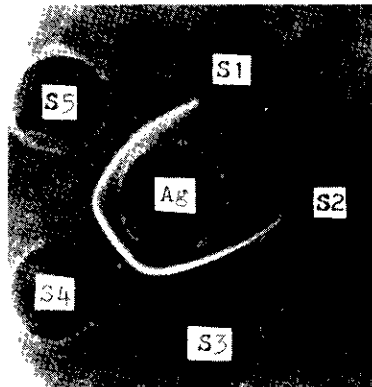
由於豬水疱病不顯性感染病例在野外常發生，目前尚缺乏試驗資料來確定幾倍之血清抗體為陽性，如以血清中和力價32倍為陽性時，如以免疫擴散法測定，則有21.2%為陰性（71例血清中和試驗為陽性，32倍或以上，中有15例），11.2%為疑陽性，陽性者佔67.6%，故如以免疫擴散法行抗體調查則無法測出真正之抗體分佈情形。但一般有臨床症狀之豬水疱病感染之豬，其血清中和力價甚高且持續久，如以免疫擴散法檢查可測出其抗體之存在。

螢光標示抗體診斷豬水疱病之感染，以冷凍切片法最為迅速且特異性高，豬水疱病感染豬可由冠狀帶皮膚之組織切下一小塊供冷凍切片檢查其抗原之存在，如將病豬撲殺則可由扁桃腺，舌及吻部之皮膚組織做冷凍切片來診斷。感染豬之水疱液可供組織培養方法分離病毒並行螢光標示抗體之特異染色。

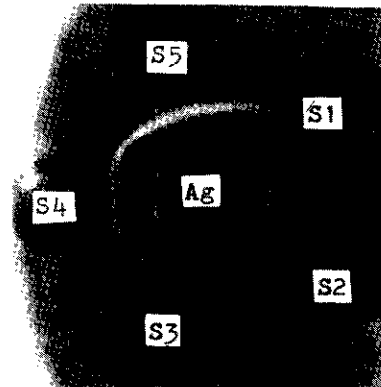
由本試驗結果指出，對豬水疱病之急速診斷在檢出病原時應以螢光標示抗體法最為迅速確實。如有感染豬之水疱液和豬水疱病之免疫血清時亦可以免疫擴散法來診斷病原。血清疫情學之調查時應以中和試驗法較為敏感，但如大規模之調查免疫擴散法亦值得應用。

Table Correlation between double immuno-diffusion and serum neutralization tests

No. of test sera	Serum neutralization titers							Total
	4	8-15	16-3	132-63	64-127	128-255	256	
DID	20	20	20	15	20	16	20	131
Positive	0	0	1(5%)	3(20%)	9(45%)	16(100%)	20(100%)	49(37.4%)
Doubtful	0	1(5%)	1(5%)	3(20%)	5(25%)	0	0	10(7.63%)
Negative	20(100%)	19(95%)	18(90%)	9(60%)	6(30%)	0	0	72(54.97%)



A.



B.

Fig 1. Double immuno-diffusion test for detecting SVD antibody

Ag : SVD antigen, S : Test sera

A. S1-S2 negative sera with serum neutralization titers below 8X

S3-S5 positive sera with SNT titers higher 516X

B. S1 doubtful reaction serum with SNT titer of 32X, S2 weak positive serum with SNT titer of 64X, S3, S4 and S5 were positive sera with SNT titers of 128X, 256X and 516X respectively.

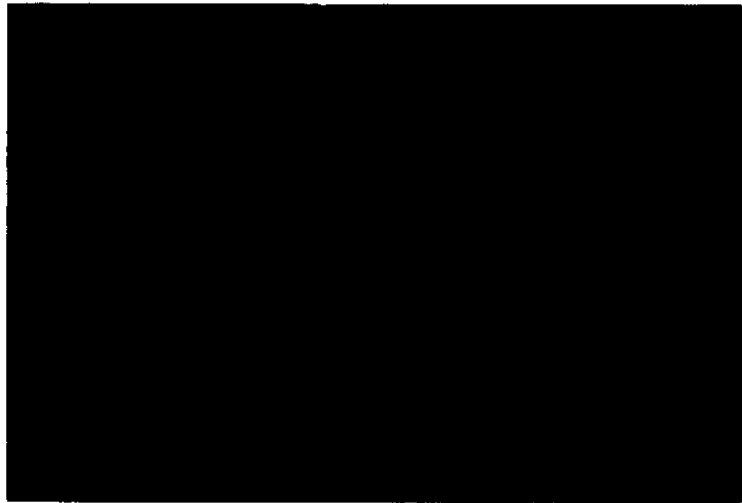


Fig. 2. Immunofluorescent positive epithelial cells seen in a tonsillar crypt. Frozen section was made from a SVD infected tonsil, 48 hours post-infection intravenously, 400X

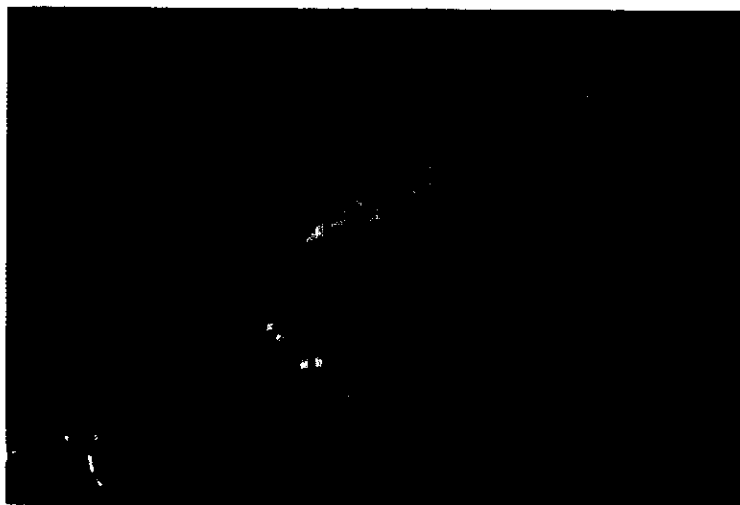


Fig. 3 Fluorescence in epithelial cells of coronary band, 48 hours after infection with SVD virus, 160X

## 中文摘要

豬水疱病之診斷以螢光標示抗體法最迅速且特異性高。免疫擴散法及血清中和法亦均能應用於豬水疱之診斷及血清學之調查，前者之敏感度遠較後者為低，但特異性則較高。以免疫擴散法測定 131 頭血清，呈陽性者有 49 頭佔 37.4%。血清中和力價在 4 倍以下者免疫擴散法均呈陰性。而血清中和力價在 128 倍或以上者均呈陽性。

## 誌 謝

本研究之經費，承蒙農復會之補助。僅於此誌萬分謝忱。作者亦感謝本所疫情系系主任呂榮修贈送豬水疱病免疫血清。

## 參考文獻

1. 林再春，賴秀穗、程永昌，謝竹茂，陳曲昌，陳正吉，李正雄，吳義興。豬瘟螢光抗體診斷法之研究，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告. No. 6 ; 23-32, 1969。
2. Anonymous (1974) : West Germany, Switzerland and Japan report SVD outbreaks. IN : Foreign animal disease report, USDA, Jan. 5 : 5-6.
3. Brown, F. Talbot, P., and Burrows, R. (1973) : Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to Coxsackie B5 virus. Nature 245 : 315-316.
4. Dawe, P. S., Forman, A. J., and Smale, C. J. (1973) : A preliminary investigation of the swine vesicular disease epidemic in Britain. Nature 241 : 540-542.
5. Delagneau, J. F., Guerche, J., Adamowicz, P., and Prunet, P. (1974) : Swine vesicular disease : Properties of the virus strain France 1/73. Ann. Microbiol. (Paris) 125B : 559-574.
6. Dhennin, L., Dhennin, L., and Gourreau, J. M. (1973) : La maladie vesiculeuse du porc. Bull. Acad. Vet. Fr. 46 : 47-51.
7. Mowat, G. N., Darbyshire, J. H. and Huntley, J. F., (1972) : Differentiation of a vesicular disease of pigs in Hong Kong from foot-and-mouth disease. Vet. Rec. 60 : 618-621.
8. Nardelli, L., Lodetti, E., Gualandi, G. L., Burrows, R., Goodridge, D., Brown, F., and Cartwright, B. (1968) : A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. Nature 219 : 1275-1276.
9. Newan, J. F. E., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1973) : A physicochemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses. J. Gen. Virol. 18 : 171-180.
10. Ohashi, Y. (1974) : The first case of swine vesicular disease in Japan. Bull. Off. Int. Epiz. 81 : (9-10) , 839-843.

## Studies on the Rapid Diagnosis of Swine Vesicular Disease

S. S. Lai, W. C. Ho, T. S. Huang, S. K. Wan.

### Summary

For detecting swine vesicular disease (SVD) antigen, immunofluorescence technique was recommended. However, both double immuno-diffusion (DID) and serum neutralization test (SNT) could be also applied for the diagnosis and serological survey of SVD. DID was less sensitive than SNT in detecting SVD antibody. DID were performed in parallel with SNT in a total of 131 serum samples. 49 of 131 sera (37.4%) showed positive in DID. None of 20 sera with serum neutralization titers equal or lower 1:4 was positive in DID. Conversely, none of 36 sera with serum neutralization titers of 1:128 or higher was negative in DID.