

猪瘟螢光抗體診斷法之研究

林再春 賴秀穗 程永昌 謝竹茂
陳由昌 陳正吉 李正雄 吳義興

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

猪瘟之研究及其診斷，最後之判定在過去必賴猪隻接種試驗，以檢出其病原，需費至鉅且費時日，此外尚有許多不方便之處，因此不但對猪瘟研究之進展阻碍甚大，又在田間發生可疑病例之診斷亦因而無法收到時效。

自 Coons (1950) 研究螢光抗體法成功後，已能將抗原與抗體之反應於顯微鏡下直接觀察檢出病原，至1962年 Solorzano²⁰⁾ 首次應用該法於猪瘟之診斷以來，再經 Men-geling 等許多研究者^{1-4, 6-8, 10-19)} 相繼加以檢討及改良其方法，咸認其特異性甚高，且能於短時間內得到正確之診斷結果，為猪瘟診斷之最理想方法。

筆者(林)^{6,7)} 曾報告螢光抗體一組織培養法在猪瘟病毒之檢出與定量其特異性及迅速性均高且操作簡便。為期在本省螢光抗體亦能早日應用於猪瘟診斷，猪瘟之感染發病病理，筆者等自前(57)年7月起設立螢光抗體檢查室積極充實有關設備並應用於田間可疑病材之診斷。茲將所得成績報告於後。

試驗材料及方法

1. 試驗材料

- 1) 可疑病材：由各縣市送檢之可疑猪瘟病材，共37例供以螢光抗體法及病理組織等檢查。
- 2) PK-15 株化細胞：係由日本農林省家畜衛生試驗場（以後簡稱日本家衛試）分讓，繼代方法採用 3~4 天培養細胞，每週二次，3 倍稀釋法。凍結保存即將 PK-15 株化細胞以 Dimethyl Sulfoxide 於零下 70°C 凍結保存。
- 3) 猪瘟毒株：係本所製造猪瘟血清及疫苗檢定所用之 ALD 株對 SPF 小豬之 ID₅₀ 10⁻⁸。
- 4) 供試豬：本所 8 週齡 SPF 小豬及其猪瘟試驗耐過豬。
- 5) 螢光顯微鏡：係採用 Nikon 牌螢光顯微鏡，東芝牌 SH 200 高壓水銀燈，ASA 200 富士牌軟片。
- 6) 特殊藥品：螢光色素：Fluorescein isothiocyanate (FITC) 美國 BBL 製。
Sephadex: G-25 Coarse, 瑞典 Pharmacia Uppsala 製。
DEAE : Cellulose Ion Exchanger, Serra 西德製。
Trypsin : 1:250 美國 Difco 製。
EDTA : Disodium ethylenediamine Teraaceta Dihydrate Dottite ZNA 試藥，日本和光製。

2. 猪瘟螢光標示抗體液之試製法：

供為本所研究之螢光標示抗體液係參照筆者(林)前報告^{6,7)} 之方法試製共 3 批，其試製方法簡述如下：

1) 高度免疫血清之製造：

使用 8 週齡 SPF 小豬以活毒兔化疫苗 1 劑量皮下注射，行基礎免疫14天後以 ALD 毒血清 1ml

(臺灣畜衛試研報6, 23~32, 1969)

皮下接種攻擊，並每隔 7~9 天再以 ALD 毒血清 100 ml 及 150 ml 行腹腔注射共三次，於最後攻毒後第14天放血，分離血清並測定其中和抗體價供為螢光標示抗體液之試製。

2) 豬瘟螢光標示抗體液試製過程：

SPF 豬高度免疫血清

r 球蛋白之分割調製

加等量之硫酸銨飽和液，冷卻遠心分離 3700 rpm, 30分 3次，再以 0.01M pH 7.2 PBS 於冰室內透析。

螢光色素 FITC 之標示

r 球蛋白液之蛋白濃度測定後，經以 F/P 比率 1:50 與 FITC (以 0.5M pH 9.0 Carbonate-Bicarbonate緩衝液先行溶解) 結合後於冰室攪拌一夜。

標示抗體之精製

Sephadex Column 之通過，除去未結合 FITC 色素後，繼續於冰室以 0.005M pH 7.0 PBS 透析後再通過 DEAE Column 除去非特异性螢光物質。

標示抗體液之檢查

染色力價測定及非特异性檢查。

分裝保存

於零下 20°C 凍結或以 Millipore filter 無菌濾過後於冰箱保存。

3. 豬瘟病毒檢出及定量法：

A. 螢光抗體一組織培養法 (Fluorescent Antibody Cell Culture Technique, 簡稱 FACCT)。

依照筆者 (林)^{6,7)} 報告之方法實施之，將其方法簡述於後：

1) PK-15 單層細胞培養：培養 3~4 天之 PK-15 細胞，經以 TV 液 (0.1% Trypsin 及 0.01% EDTA 之混合) 消化培養於 Leighton 試管或 3cm 小燒皿之蓋玻璃片，經 16~20 小時培養即形成單層細胞其培養液配方如下：

Earle 氏液含有

山羊血清 (GS)	10%
7% Na HCO ₃ 液	2%
抗生素液	0.5~1%

(Penicillin 200u/ml Streptomycin 200r/ml Kanamycin 20r/ml)

2) 可疑豬瘟臟器乳劑接種：將送檢之可疑豬瘟臟器材料，例如扁桃腺、脾、腸淋巴腺等之 20 倍乳劑 (Earle 氏液含有 GS 5%，抗生素 2%) 或其血液等分別以 0.5~1.0ml 接種於上述單層細胞，放置置 37°C 3 小時，取出以 PH 7.2 PBS 洗滌三次，再加入培養液繼續培養 24~48 小時。

3) 染色方法：上述病材乳劑接種 24 及 48 小時後之 PK-15 單層細胞，依照下列方法以螢光標示抗體液染色之。取出蓋玻片→0.01M PH 7.2 PBS 洗滌 (換液 4, 5 次) →吹乾→以無水丙酮室溫固定 10 分→吹乾→滴下標示抗體液→37°C 1 小時，染色 (密封) →PBS 洗滌 (換 PBS 4, 5 次) →50% 甘油—PBS 液封入。

4) 鏡檢：以 UV 勵起或 BV 勵起鏡檢 PK-15 細胞質之特異螢光即豬瘟抗原形成 Plaques。

B. 螢光抗體一塗抹法 (Fluorescent Antibody Smear Technique, 簡稱 FASMT)

參照佐藤等報告¹⁵⁾ 之方法實施之將其方法簡述於後：

- 1) 感染扁桃腺 (或脾、淋巴腺) 組織之塗抹，吹乾。
- 2) 以無水丙酮室溫固定 10 分，吹乾。

- 3) 滴下螢光標示抗體液。
- 4) 37°C 1小時 (密封) 反應, 染色。
- 5) PBS 洗滌15分 (換液4~5次)。
- 6) 以50%甘油—PBS 液封入。
- 7) 鏡檢, 即觀察扁桃腺窩上皮細胞之特異螢光。

C. END法。

依照熊谷等^{5,9)} 報告方法實施之, 將其操作方法簡述於後:

- 1) 病毒稀釋: 將被檢乳劑或血清以 Earle 氏液 (含 5%GS) 以10倍稀釋法稀釋之。
- 2) 培養: 上項稀釋病毒液每一階段分裝 8 支試管各 0.1ml 後加入畢丸細胞 (ST) 液 0.4ml, 37°C 培養 4 天。
- 3) 攻毒: 抽去舊培養液後, 以 NDV (1 HA價) 接種攻擊 37°C 培養 3 天。
- 4) 判定: 觀察 ST 細胞, 呈 CPE 者為豬瘟陽性。

試 驗 成 績

1. 螢光標示抗體液之試製:

使用 2 個月齡 SPF 猪 2 頭, 經以兔化疫苗基礎 免疫後再以強毒 ALD 血清每隔 7 天共 3 次之豬瘟感染血清大量刺激注射, 即可得到中和抗體價均為 4,096 倍以上之豬瘟高度免疫血清。

以上述高免疫血清試製螢光標示抗體液 3 批, 經測定其染色力價及檢定非特異性結果如表 1, 可得到特異性甚高且染色力價 4~8 倍以上之螢光標示抗體液。

至於試製之螢光標示抗體液之保存性, 經保存於 2~4°C 3 及 6 個月後之保存性如表 2, 其染色力價未見顯着降低。

表 1 試製螢光標示抗體液之檢定成績

Lot	Fraction	螢 光 標 示 抗 體 (ml)	螢 光 抗 原 (強 度)	非 特 異 性	染 色 力 價	對 照 細 胞 (非 特 異 性 程 度)
I	I	30	卅	±	× 4	±
	II	15	卅	±	× 2	±
	III	20	卅	+	原	+
	IV	15	卅	+	原	+
II	I	35	卅	±	× 8	±
	II	25	卅	±	× 8	±
	III	20	卅	±	× 4	±
III	I	20	卅	—	× 8	—
	II	40	卅	—	× 4	—
	III	40	卅	±	× 4	±
對 照	日 製	卅	±	原	±	

註: 1) 每批使用高度免疫血清 50ml。

2) Lot I Fraction III、IV 因其非特異性較高而棄之。

3) 染色力價示適當之稀釋倍數。

4) 對照之螢光標示抗體為日本家衛試製品。

表 2 試製螢光標示抗體液之保存性

供 試 病 材	冷 室 6 個 月		冷 室 3 個 月
	Lot I	Lot II	Lot III
A L D 血 清 (×20)	卅	卅	卅
猪 瘟 陽 性 扁 桃 腺 乳 劑 (×20)	卅	卅	卅
細 胞 對 照	—	—	—

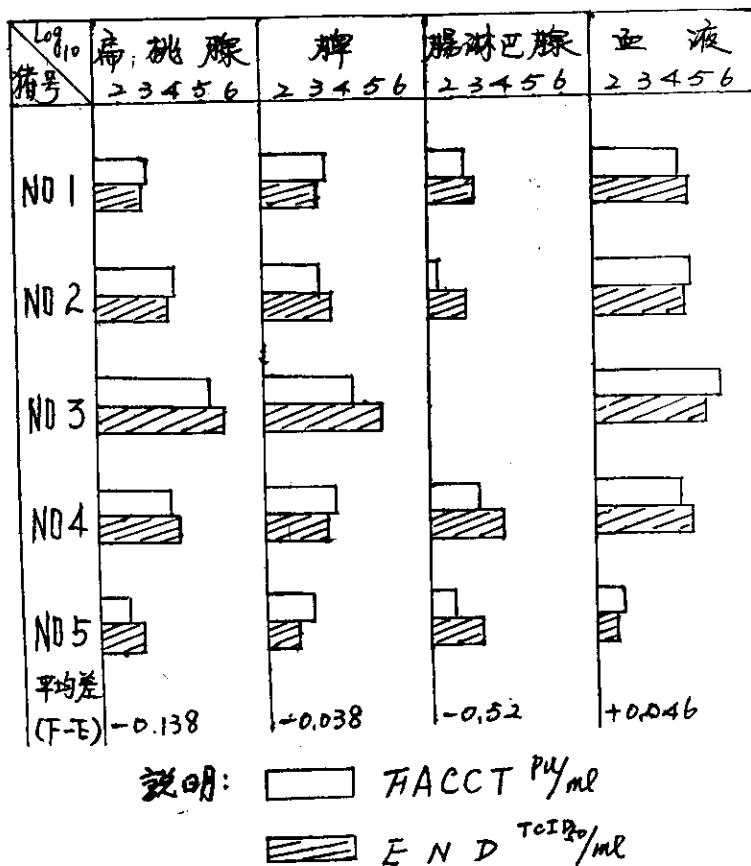
註：1) 卅示螢光強度甚強，卅示螢光強度弱。

2) 螢光標示抗體液均使用 2 倍稀釋液。

2. 螢光抗體—組織培養法與 END 法之病毒定量比較

使用猪瘟人工感染猪 5 例 (ALD 毒血×100 1ml 接種，發病 4 天後放血採材) 之臟器即扁桃腺、脾、腸淋巴腺及血液等分別以 FACCT 及 END 法測定其病毒價，其成績如圖 1，兩者間無顯着差異 (FACCT 示 Log 10 PU/ml END 法示 Log 10 TCID₅₀/ml)。

圖 1 FACCT及END品對於猪瘟人工感染猪臟器Virus價之比較

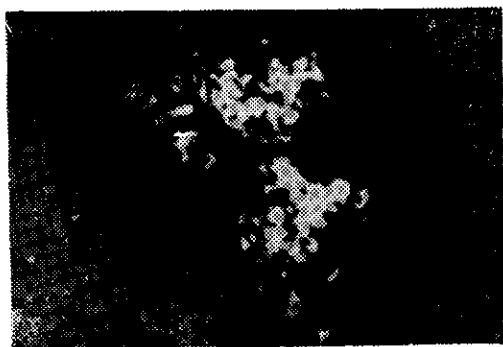


3. 田間可疑猪瘟病例之診斷應用：

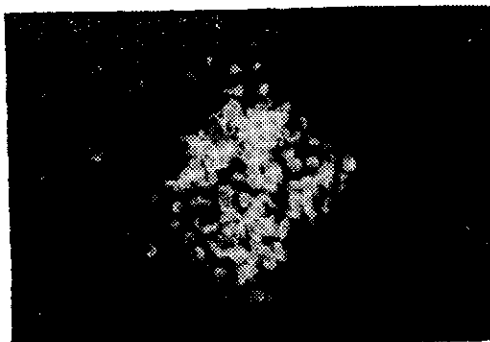
- 註：1) ※係病材另作猪隻接種試驗。請參照表 4。
2) ※※係本所試驗對照猪。
3) ※※※係疫苗接種後日數。
4) 非化膿性腦炎因部份病材短缺而未作檢查。
5) 螢光標示抗體係使用試製之 3 批，其 Fraction I 或 II，且病材呈陰性例除復試外並加猪瘟人工感染陽性血清為對照。

至於病材 No. 7 之病理解剖變化亦有猪瘟病變，但其 END 法（表 3）及猪瘟接種試驗（表 4）成績均為猪瘟陰性（病材 No. 7 僅送扁桃腺及福馬林固定之腦，其解剖變狀根據其附送之剖檢記事）。至於螢光抗體法檢查為陽性之 31 例，其解剖變狀或病理組織檢查等均呈猪瘟病變，且其 END 法亦全例為陽性。

至於田間之可疑病材呈猪瘟性者接種於 PK-15 單層細胞上之螢光抗原，經接種 24 小時後即形成所謂“Plaque”甚為清晰而易鑑別。照片 1 及 2 示經可疑猪瘟病材接種 24 及 48 小時後 PK-15 單層細胞上之“Plaque”即猪瘟抗原，該猪瘟抗原隨時間經過向周圍細胞感染擴大大。



照片 1 說明
可疑猪瘟病材 No. 3 扁桃腺 20 倍乳劑接種於 PK-15 單層細胞 24 小時後之 Plaque（接目 10×，接物 10×）



照片 2 說明
病材 No. 10 扁桃腺 48 小時後之 Plaque（接目 10×，接物 10×）

4. 螢光抗體法與猪接種試驗之比較：

上述田間病材經螢光抗體法檢查結果為陰性之 3 例，No. 1, 2, 7. 及陽性例中之 No. 21, 22. 及 23 等共 6 例。將這些病材之臟器乳劑（扁桃腺及脾×10 混合乳劑 2ml/頭）分別接種於 8 週齡 SPF 小豬共 6 隻或猪瘟試驗耐過猪共 6 隻，經試驗觀察結果如表 4，螢光抗體法陰性之 No. 1, 2. 及 7 病例對於 SPF 小豬均未發病，且於接種 14 天後，再以 ALD 毒血（100×）1ml 接種攻擊均呈猪瘟發病斃死。反之，螢光抗體法陽性例 No. 21, 22. 及 23 經接種於猪瘟耐過猪結果均未呈現任何症狀而健存。換言之，猪瘟之螢光抗體法檢查結果與猪接種試驗成績完全一致。

表 4 螢光抗體法與豬接種試驗之比較

試驗別	病 材 NO.	螢 光 抗 體 法	豬 接 種 試 驗				
			豬 別	接 種 頭 數	接 種 病 材 乳 劑 量	接 種 後 情 形	攻 毒 結 果
1	1	-	S P F 小 豬	2	臟 器 乳 劑 X10 2ml Sc	均無任何症狀 健 存	豬 瘟 發 病 死
	2	-	"	2	"	同 上	同 上
	7	-	"	2	"	同 上	同 上
	毒血對照		"	1			同 上
2	21	+	豬 瘟 耐 過 小 豬	2	臟 器 乳 劑 X10 5ml SC	均無任何症狀 健 存	
	22	+	"	2	"	同 上	
	23	+	"	2	"	同 上	
	毒血對照		S P F 小 豬	1	ALD毒血×100 1ml SC	豬 瘟 發 病 死	

註：1) 螢光抗體法成績請參照表 3。

2) 病材乳劑係扁桃腺及脾之10倍混合乳劑，皮下接種。

3) 攻毒係於病材接種觀察14天後再以 ALD 毒血100倍 1ml 皮下接種攻擊。毒血對照同。

討 論

螢光標示抗體所需之豬瘟高免血清，使用 SPF 小豬（約 2 個月齡）經以活毒兔化疫苗基礎免疫後，再以強毒血清（ALD毒）三次之刺激注射，其中和抗體價即能達 $\times 4,096$ 以上，該高免血清對於豬瘟診斷用螢光標示抗體之調製甚為適用，經以硫酸飽和液分割 r 球蛋白，再以 F/P 比率 $1/50$ 之 FITC 色素標示後僅通過 Sephadex Column 及 DEAE Column 除去未結合之 FITC 色素及非特異性螢光物質，雖未再經白鼠肝粉吸着之複雜操作亦可得非特異性甚高且染色力價 $4\sim 8$ 倍以上之螢光標示抗體液。今後即可按此方法大量調製豬瘟螢光標示抗體液以供需要。

豬瘟診斷之螢光抗體法可分為螢光抗體一組織培養法、螢光抗體一塗抹法及螢光抗體一凍結切片法等三種方法。螢光抗體一組織培養法者，由 Mengeling^{10,11,12,13}等所考案，係將病材乳劑接種於豬腎株化細胞之 PK-15 單層細胞後，以螢光標示抗體液染色檢出病毒之方法，嗣後經 Carbey 等^{2,3}，Robertson 等¹⁶，Ressang 等^{14,15}，Karasszan 等⁵，姜等⁴及筆者（林）等⁷加以檢討及改進並確認其豬瘟病毒檢出上極少非特異性反應之優良方法。螢光抗體一塗抹法者，Aiken 等¹，Sirbn 等¹⁹及佐藤等¹⁸曾嘗試臟器之塗抹片加以螢光標示抗體液染色後檢出病毒，認為最迅速之方法。至於螢光抗體一凍結切片法由 Robertson 等¹⁷，Moess 等⁸及 Zimmerman²²試以豬瘟感染豬之臟器製作凍結切片後，以螢光標示抗體液染色而檢出病毒，認為甚為理想之方法，惟需特殊設備方能應用。

筆者（林）於人工感染豬體內之豬瘟毒感染增殖之研究報告，於強毒病毒接種24小時後即由扁桃腺及脾檢出病毒，至48小時後即由顎下等數處淋巴腺檢出病毒，且其病毒價均為甚高，認為以螢光抗體法檢出之最適當臟器材料。又 Aiken 等¹，Carbey 等³，佐藤等¹⁸亦認為豬瘟病毒之主要增殖場所為扁桃腺、脾、淋巴腺等，故本研究採用該三項臟器及血液為螢光抗體法之主要病材，經屢次實驗尤以扁桃腺認為最適當材料。

本省現尙未有螢光抗體專用之凍結切片設備，因此尙無法應用螢光抗體一凍結切片法外其餘二法均隨時可以應用。至於螢光抗體一組織培養法 (FACCT) 及螢光抗體一塗抹法 (FASMT) 之二方法於豬瘟診斷應用上各有其長短，螢光抗體一組織培養法者豬瘟抗原即於純粹之株化細胞 PK-15 單層細胞上形成所謂 "Plaque" 其螢光抗原甚為清晰，而其特异性最高且於病材接種24小時後，即可判定結果 (接種後24小時檢查陰性者為慎重計就其48小時者再行染色檢查)。加之，PK-15株化細胞之繼代簡便隨時可以供用一點，實有更提高螢光抗體一組織培養法之應用價值。螢光抗體一塗抹法者，雖其操作簡便能於更短時間內 (3~4小時) 而判定結果，惟其非特异性高，致在判定上易遭受困難，需由經驗相當豐富之技術人員方能得到正確之診斷。

本所自去 (58) 年 5 月購進螢光顯微鏡 Nikon 牌一套並積極充實有關設備，設立「螢光抗體檢查室」，並召開 6 縣市家畜疾病防治所技術人員之講習且得圓滿結束，今後螢光抗體法不但可應用於豬瘟診斷，且於豬瘟之感染機序，發病病理及其活毒疫苗等之研究均裨益至鉅。

結 論

1. 高度免疫豬瘟血清之製作，使用 2 個月齡 SPF 小豬經以兔化疫苗基礎免疫後，再以強毒血清 3 次之刺激注射，其中和抗體價即能達 4,096 倍以上，甚適用於螢光標示抗體之製作。

2. SPF 豬高免豬瘟血清經 r 球蛋白之分劃後與其 $1/50$ (F/P 比率) 濃度之螢光色素 FITC 結合標示，再通過 Sephadex Column 及 DEAE Column 除去未結合之 FITC 色素及非特异性螢光即可得特异性甚高且染色力價 4~8 倍以上之螢光標示抗體。該項螢光標示抗體於冷室保存 6 個月後之染色力價未見顯著降低。

3. 螢光抗體一組織培養法及 END 法，對於豬瘟人工感染豬臟器之病毒價測定比較結果略為一致，今後對於豬瘟及活毒疫苗之研究如病毒之檢出與定量等甚為方便。

4. 田間之豬瘟可疑病例共 37 例，經螢光抗體一組織培養法螢光抗體一塗抹法鑑定結果與 END 法，病理組織變化，剖檢病變等項成績略同，且其中螢光抗體法陰性及陽性各 3 例經豬接種試驗比較結果完全一致。螢光抗體之特异性優異，且可迅速獲得結果，今後可普遍用於豬瘟之診斷。

本研究之完成，得國家科學委員會及農復會之研究經費補助，並承農復會李組長崇道博士、楊顧問守紳、林技正本欽、劉技正永和及本所陳所長守仕等先生之鼓勵與指導，謹致衷心之謝忱。

在研究期中，曾承日本農林省家畜衛生試驗場清水悠紀臣博士助言與指導，謹此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. Aiken, J. M., Hoopes, K. H., Stair, E. L. & Rhodes, M. B.: Rapid diagnosis of hog cholera: A tissue impression fluorescent-antibody technique. J. Am. Vet. Med. Ass. 150, 59-61 (1964).
2. Carlbrey, E. A., Stewart, W. C., Kresse, J. I. & Lee, L. R.: Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. Proc. 69th Ann. Meet. U. S. Livestock Sanit. Ass. 487-500 (1965).
3. 姜炳稷，清水悠紀臣，古內進，熊谷哲夫：螢光抗體法による豚コレラウイルスの検出，日本獸醫學雜誌，28. 474. (1966)。
4. Karasszon, D. & Bodon, L.: Demonstration of the swine-fever virus in tissue culture by immunofluorescence. Acto Microbiol. Hung. 10, 287-291 (1963).
5. Kumagai, T., Simizu, T., Ikeda, S. & Matumoto, M.: A new in vitro metho (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of stanard procedure. J. Immunol. 87, 245-256 (1961).

6. 林再春：螢光抗體法による強毒すび弱毒豚コレラウイルスの感染増殖に関する研究，獸醫學博士學位論文，日本麻布獸醫科大學(1968)。
7. Lin, T. C., Kang, B. J., Shimizu, Y., Kumagai, T. & Sasahara, J.: Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for detection and titration of hog cholera virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 9, 10-19 (1969).
8. Maess, J. & Liess, B.: The immunofluorescence method for the laboratory diagnosis of swine fever. *Zentbl. Vet. Med.* 13B, 660-670 (1966).
9. Matumoto, M., Kumagai, T., Shimizu, T. & Ikeda, S.: A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. II. Some characteristic of END method. *J. Immunol.* 87, 257-268 (1961).
10. Mengeling, W. L., Pirtle, E. C. & Torrey, J. P.: Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence; Application as a diagnostic and assay method. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27, 249-252 (1963).
11. Mengeling, W. L.: Field evaluation of the fluorescent-antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. *Proc. Book, 101st Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass.* 274-275 (1964).
12. Mengeling W. L. & Torrey, J. P.: The diagnosis of hog cholera by the fluorescent antibody technique. Report of the FAO/OIE Intern. Meet. on Hog Cholera and African Swine Fever. Rome, May 31-June 5, 1965.
13. Mengeling, W. L. & Torrey, J. P.: Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for hog cholera diagnosis. *Am. J. Vet. Res.* 28, 1653-1659 (1967).
14. Rensang, A. A. & Bool, P. H.: Swine fever diagnosis. II. The fluorescent antibody technique. *Tijdschr. Diergeneesk.* 91, 1148-1163 (1966).
15. Rensang, A. A. & Den Boer, J. L.: A comparison between the cell culture, frozen tissue section, impression and mucosal smear techniques for fluorescent antibody in the diagnosis of hog cholera. *Tijdschr. Diergeneesk.* 92, 567-586 (1967).
16. Robertson, A., Greig, A. S., Appel, M., Girard, A., Bannister, G. L. & Boulanger, P.: Hog cholera. IV. Detection of the virus in tissue culture Preparations by the fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29, 234-241 (1965).
17. Robertson, A., Bannister, G. L., Boulanger, P., Appel, M. & Gray, D. P.: Hog cholera. V. Demonstration of the antigen in swine tissues by the fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29, 299-305 (1965).
18. 佐藤卯三郎，澤田實，花木琢磨，松野直治，信藤謙藏：扁桃直接塗抹螢光抗體法による豚コレラの早期診断について，日本獸學雜誌，29, 70-71 (1967)。
19. Sirbu, Z., Ieremia, D. & Bona, C.: Immunofluorescent microscopy in the diagnosis of swine fever. *Brit. J.* 120, 587-591 (1964).
20. Solorzano, R. F.: An in vitro test for hog cholera. Ph D. Thesis, Pennsylvania State University, University Park (1962).
21. Stair, E. L., Rhodes, M. S., Grace, O. D. & Aiken, J. M.: Fluorescent antibody for diagnosis of hog cholera. *Proc. 67th Ann. Meet. U. S. Livestock Sanit.*

Ass. 599-606 (1964).

22. Zimmermann, T.: Immunofluorescent diagnosis of swine fever. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 74, 250-252 (1967).

STUDIES OF THE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE FOR HOG CHOLERA DIAGNOSIS

T. C. Lin, S. S. Lai, Y. C. Cheng, C. M. Shieh,
Y. C. Chen, C. C. Chen, C. S. Lee and Y. S. Wu

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

ENGLISH SUMMARY

In the past, the diagnosis of hog cholera mainly depended upon the pig inoculation to detect the hog cholera (HC) virus, but this method wasted much money and time for its performance.

The author (Lin, 1968) has reported the fluorescent antibody-cell culture test (FACCT) method characterized in high specificity and rapidity for the detection and titration of HC virus. In order to apply the fluorescent antibody technique (FAT), as early as possible in Taiwan, on the diagnosis and research of HC, the authors have established the FAT investigation room and applied the technique for the diagnosis of the field suspected HC cases since July, 1968

The experimental results are summarized as follows:

1. The specific anti-HC hyperimmune serum could be obtained and used as the source of preparation of HC fluorescent antibody by employing SPF pig of about two months of age with inoculation of a single dose of HC live vaccine for basic immunization, and three more booster injections of virulent HC virus infected serum. The sera thus obtained showed a high neutralizing antibody titer of 1:4,096, and considered satisfactory to the preparation of HC fluorescent antibody.

2. The gamma-globulin was precipitated by applying the saturated ammonium sulfate solution to the hyperimmune serum, then the protein concentration of the globulin solution was determined and conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) at the fluorescein-protein ratios of $1/50$. The conjugate passed through the Sephadex and the DEAE columns to remove the unconjugated FITC dye and non-specific fluorescein. The conjugate thus obtained through these procedures was very specific to HC virus and showed a staining titer of 1:4 to 1:8, and there was no obvious decrease in its staining titer after storing in the ice box (4°C) for six months long.

3. The FACCT and the END method were compared as the method of detecting and titrating HC virus from the infected pig materials. There were no remarkable differences between the two methods in their detection rates and infection titers of the virus. It is very useful and convenient to apply the FACCT method in studying HC virus.

4. In applying for the diagnosis of the field suspected HC cases (37), the results obtained by FACCT and fluorescent smear test (FASMT) were almost in accordance with those got from END method, pathological changes, necropsy findings, and swine inoculation. In addition for its high specificity and rapidity in detecting HC virus, the FAT method is of great worth to apply for the diagnosis of HC.