

2004 年台灣動物傳播性海綿狀腦病與狂犬病監測

李淑慧*、蔡國榮、張國慧、張仁杰、洪哲惇、丁履紉、宋華聰

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

2004 年共監測 859 例 24 月齡以上牛腦，其中 826 例係屠宰場逢機採樣檢體、3 例結核病撲殺牛隻、6 例加拿大進口追蹤列管臨床上呈衰弱或死亡牛隻、1 例流行熱病例及 23 例採自高齡淘汰乳牛，檢驗結果牛海綿狀腦病皆為陰性。監測 59 頭 24 月齡以上羊腦，檢體取自衰弱淘汰乳羊，檢驗結果傳播性海綿狀腦病為陰性。此外應用酵素連結免疫吸附法檢測 3,204 件犬隻血清中狂犬病抗體，其中家犬佔 1,380 件，陽性率為 58.6%，流浪犬佔 1,821 件，陽性率為 35.9%，顯示國內犬隻狂犬病預防注射率仍有提高之空間。另應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法及反轉錄聚合酶鏈反應，檢測 90 例犬腦組織，包括 1 例為犬瘟熱病例、2 例疑似中毒病例、6 例腎衰竭病犬、2 例走私犬及 79 例流浪犬，結果皆未檢測出狂犬病抗原及特徵性病變。綜合前述監測結果，台灣至今為傳播性海綿狀腦病及狂犬病之非疫區。

關鍵字：動物傳播性海綿狀腦病、狂犬病、監測

緒言

傳播性海綿狀腦病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)係造成感染動物的腦組織出現類似海綿狀變性病變的疾病，又稱普里昂疾病(prion disease)，這類疾病包括人的庫賈氏症(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)、牛海綿狀腦病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE,俗稱狂牛病)、綿羊搔癢症、傳播性貂腦病、鹿與麋鹿的慢性消耗病(或狂鹿症)以及貓科動物海綿狀腦病。各種傳播性海綿狀腦病的致病機序並不完全相同，真正的致病原因目前尚未完全清楚，目前認定致病原為「變性普里昂蛋白質」(prion protein) PrP^{Sc}，它不屬於細菌、病毒或寄生蟲，而是一種結構不正常的蛋白質，對熱、紫外線、輻射照射及消毒劑有很強的抵抗性，以一般物理或化學方法並無法將其破壞。由於致病過程相當緩慢，所以一般需要經過數年的潛伏期才會發

病。1986 年 BSE 首先於英國被發現，目前歐洲大多數的國家、日本、加拿大及美國等陸續發現本病而成為疫區。BSE 的發生除對畜牧產業帶來衝擊外，1996 年發現的人類新變異型庫賈氏症(new variant CJD)更被認為可能和曾經食入感染牛海綿狀腦病的牛製品有關，其在人畜共通傳染病防治上的重要性，不言而喻。

狂犬病是古老且重要的人畜共通的疾病，幾乎所有溫血動物都可感染，主要經咬傷後自傷口感染，病毒進入體內經過長短不一的潛伏期後，最後到達中樞神經，引起嚴重的神經傷害，繼而造成肌肉麻痺、昏迷和死亡。本病病原為桿狀病毒科(*Rhabdoviridae*)之 Lyssavirus 病毒屬。病毒顆粒大小為 75 × 180 nm，形如砲彈狀，具外膜，病毒核酸屬於線狀單股 RNA 病毒。犬隻的潛伏期平均為 3 至 8 週，發病後約 5 至 7 天死亡。臨床症狀可分為前驅期、狂躁期及麻痺期，狂躁期犬隻呈現興奮、流涎、無目的吠叫及狂暴，

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

有些病犬症狀不明顯或無此期表徵而進入第三期，病犬咽頭肌肉麻痺，下顎麻痺開口流涎無法飲食，最後陷入昏迷而死亡。人的臨床症狀：發病時會有焦慮、頭痛、發燒、咬傷部位有異樣感，然後會出現麻痺及飲水時有吞嚥困難的現象，見到水即誘發咽喉部肌肉之痙攣，即所謂恐水現象，且併有精神錯亂及抽搐之情形，最後因呼吸麻痺而導致死亡。本病為古老之疾病，幾乎分佈於全世界。台灣早年亦有本病發生，經各方努力後目前為亞洲地區極少數非疫區國家之一。據 2001 年世界衛生組織的資料，估計全世界每年約有四萬至七萬人死於本病，以亞洲及非洲國家發生較多。

材料及方法

動物傳播性海綿狀腦病之診斷及監測

病材來源：為達成世界動物衛生組織之非疫區認定條件，本所自 1998 年 7 月 1 日開始進行牛海綿狀腦病之持續性監測工作，採樣對象為 24 月齡以上出現之神經症狀病死牛隻、屠宰場或化製場逢機採樣、結核病陽性撲殺牧場每場次採樣一頭及其他原因送檢至本所檢驗之病例。採取之牛腦以腦幹為重點部位，用刀從中線對稱地將腦切割成兩半，其中一半牛腦冷凍保存於 -20°C ；另一半的牛腦置於 10 % 中性福馬林液固定液。本年度監測對象擴及 24 月齡以上出現神經症狀之病死羊或屠宰場逢機採樣高齡淘汰乳羊，腦組織採樣及監測方法同牛海綿狀腦病之診斷及監測方法。

監測方法：BSE 的診斷以組織病理學為主，並至少應配合免疫組織化學染色法或西方免疫墨點法或酵素連結免疫吸附分析法等其中一種檢驗方能確診。福馬林固定部份以組織病理學診斷方法進行檢驗；冷凍部份以西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法進行篩檢。組織病理切片若觀察到懷疑之病變或西方免疫墨點法及酵素連結免疫吸附分析法出現疑陽性結果時，則再以免疫組織化學染色法確診之。

組織病理學診斷：將採集的腦組織置於 10 % 中性福馬林液固定完全後，取大腦、小腦及腦幹共 10 個部位的腦組織，其重點部位為延腦 (medulla oblongata) 成“V”字形尖端的門 (obex)，修整成約 4 mm 的厚

度，放入脫水包埋盒中，再浸泡於 98% 的蟻酸中 1 小時 (將具感染能力的 prion 不活化)，然後再浸泡於 10 % 中性福馬林液中 2 天。再依一般例行之病理切片方法，將組織塊脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成 3-5 μm 厚之切片，脫蠟後以 H & E 染色及封片，於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片中的病理變化。

免疫組織化學染色法：利用對 prion 蛋白質特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測腦組織中的 PrP^{Sc} 。其組織切片製作方法與組織病理學診斷之步驟相同，但將切片厚度調整為 10 μm ，每次染色需同時染陽性對照 (來源：分讓自美國肯德基州立大學之綿羊搔癢症病例切片)。組織切片如常規進行脫蠟後，以磷酸鹽緩衝液 (0.1 M phosphate buffer solution, PBS; pH 7.2) 洗 3 次，每次 5 分鐘，置於蛋白酶 K 溶液 (1 M tris/HCl, pH 8.0, 2.5 mL + 0.1 M CaCl_2 , 0.75 mL + 14.7 mg/mL proteinase K 17 μL + with distilled water adjust to 50 mL) 中 37°C 15 分鐘。將切片放入不銹鋼盒中加入沸水，置於 1 bar 121°C 高溫高壓滅菌器中 20 分鐘後，再以上述 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，然後置於甲醇-雙氧水溶液 (30 % H_2O_2 1.5 mL + 50 mL methanol) 中 5 分鐘以去除內源性過氧化氫，再以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。取出切片，組織周圍以無塵拭紙吸乾水分，置於保溼盤中，在組織上滴滿 5 % 的正常豬血清 (約 200 μL)，於室溫 20 分鐘，倒掉血清。在組織上滴滿 PrP 單株抗體 (1:1000 F99/97.6.1 anti-PrP monoclonal antibody, VMRD Inc.)，置於 37°C 4 小時或隔夜，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘。在組織上滴滿次級抗體 (biotinylated secondary antibody, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 10 分鐘，以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，在組織上滴滿受質 (peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate Detection Kits)，置於室溫 10 分鐘。以 PBS 洗 3 次，每次 5 分鐘，再用蒸餾水洗去鹽類，在組織上滴滿 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 呈色劑或 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 呈色劑 (substrate, DAKO ChemMate Detection Kits)，於室溫 5 分鐘，用蒸餾水洗。滴上蘇木精複染數秒，然後水洗，滴上封片膠，

蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下鏡檢。

西方免疫墨點法 (Western immunoblot method)：採用商品化檢測套組 (Prionics®-Check, Roche Applied Science)，其原理主要是偵測腦組織中對蛋白酶 K (proteinase K) 有抵抗性的 PrP^{Sc}，因為正常的 prion 蛋白質會被蛋白酶 K 所消化，而不正常的 PrP^{Sc} 對蛋白酶 K 具有抗性，只會被部分消化，所以分子量會由 32-35 kD 變為 27-30 kD [8,9,16,21]。選取延腦的門 (obex) 或腦幹或大腦灰質部的腦組織(約 0.5g)，秤重後加入 10 倍體積均質溶液(homogenization working solution)磨成均質乳劑，取 100 μ L 乳劑加 10 μ L 消化緩衝液及 10 μ L 蛋白酶 K 混合均勻後置於 50°C 加熱 40 分鐘，然後加 10 μ L 消化停止液以終止反應。再加入 100 μ L PAGE 樣本緩衝液混合均勻，加熱至 96°C 5 分鐘。架設電泳膠片，加入電泳緩衝液於電泳槽內。將待測樣本及對照樣本各加 10 μ L 於電泳膠片孔內以 200 伏特電泳 30-45 分鐘。電泳膠片取出以濕式轉漬器來進行轉漬 (transfer) 至 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上，於 4°C 150 伏特 1 小時。然後取出膜加入以 Ponceau S 染色 2 分鐘，標示標記分子的大小，然後以 TBST (tris-buffered-saline with tween-20) 脫色。以 PVDF 阻斷緩衝液於室溫震盪 0.5-1 小時，以 1:5000 倍稀釋的單株抗體，置於震盪器上於室溫反應 1-2 小時，然後以 TBST 洗 4 次，再以 1:5000 倍稀釋的次級抗體，置於震盪器上於室溫反應 0.5-1 小時，以 TBST 洗 4 次。將膜浸泡於 Luminescence 緩衝液中震盪 5 分鐘，再加入 50 μ L CDP-Star 於室溫 5 分鐘，然後將膜上的水分吸乾，置於透明保護膜內於暗房中放入 X 光底片上壓片，再沖洗底片觀察結果。

酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)：採用商品化檢測套組 (Prionics®-Check LIA kit, Roche Applied Science)，乳劑之製備方法同前，檢測步驟略述如下 [6]。取出 digestion plate，加入 100 μ L 乳劑及 50 μ L 消化溶液 (3 mL homogenization working solution + 1 mL digestion buffer + 1 mL proteinase K, 可供一盤檢驗) 混合均勻，用膠片封盤，置於 47°C 60 分鐘，加 10 (L digestion stop 中止消化反應。

取出 preincubation plate，於前三排加入 30 (L 陽性對照、陰性對照，其餘孔內加入 15 (L 乳劑與 15 (L assay buffer，每孔再加入 10 (L preincubation buffer，感作二分鐘，加入 200 (L detection antibody solution (25 mL dilution solution + 10 (L antibody solution 可供一盤檢驗) 用膠片封盤，於 500 rpm 搖晃感作 60 分鐘，再以八爪微量分注器移入 capture plate，於 500 rpm 搖晃感作 90 分鐘。以 washing solution 清洗四次，拍乾後加 100 (L chemiluminescent substrate working solution (5 mL chemiluminescent substrateA + 5 mL chemiluminescent substrateB 可供一盤檢驗)，將 capture plate 置入冷光儀 (chemiluminescence ELISA plate reader)，靜置 5 分鐘後讀取結果。

狂犬病監測與疫苗抗體調查

病例來源及監測方法：抗體監測：定期收集北、中、南、東及金門等地家犬及流浪犬之血清，應用酵素連結免疫吸附法檢測血清中之狂犬病抗體陽性率，以了解台灣犬隻抵抗狂犬病病毒入侵之能力。抗原監測：對臨床上出現神經症狀、曾咬人或是疑似狂犬病病例，並定期採集北、中、南、東流浪犬收容中心流浪犬之腦組織，應用直接免疫螢光標示抗體檢查法、組織病理學診斷法及反轉錄聚合酶鏈反應檢測狂犬病病變及抗原。

監測方法：在狂犬病的多種診斷方法中，以直接免疫螢光標示抗體檢查法為世界各診斷實驗室公認最為敏感、快速且特異性高的方法，其敏感性比接種小白鼠分離病毒高，故送檢之疑似病例或例行性監測犬腦除以組織病理學檢查病理變化外，皆需以直接免疫螢光標示抗體檢查，結果若為疑陽性時需再以反轉錄聚合酶鏈反應、老鼠神經胚胎株化細胞或實驗動物接種分離狂犬病病毒以進行確診。茲將實驗室診斷與監測方法詳述如後：

直接免疫螢光標示抗體檢查法 (direct immunofluorescent test)：本法需先將感染動物的腦組織作成捺壓片，各取一小塊 (約 0.5 cm³) 大腦皮質、延髓、小腦及海馬角 (又稱 Ammon's horn)、橋腦、丘腦六個部位組織，分別以無菌竹棒攪碎成團塊狀，將各個圓形組織團塊分別捺壓於載玻片上，再置於擦手紙上壓一下來除去多餘組織，以避免組織捺

壓片太厚。完成的捺壓片自然風乾約 30 分鐘。以 -20°C 丙酮 (Merck®) 固定 10 分鐘 (固定反應不僅可將組織黏附於玻片上, 並可同時改變細胞膜的化學特性, 利於螢光抗體穿透細胞膜與狂犬病病毒之核蛋白抗原作用), 再自然風乾。每次染色需同時染陽性對照與陰性對照。將捺壓片置於濕式染色盤內, 於組織上滴滿狂犬病螢光標示抗體 (CENTOCOR® FITC anti-rabies monoclonal globulin) 以進行染色, 置於 37°C 恒溫箱中感作 30 分鐘。捺壓片以磷酸鹽緩衝溶液 (0.01M PBS, pH8.5) 洗滌 3 次, 每次 10 分鐘。最後以二次蒸餾水洗滌一次, 洗去殘留鹽類。取出捺壓片去除多餘水份後, 滴上適量 PBS-甘油封片液 (buffered glycerol mounting medium), 蓋上蓋玻片, 置於螢光顯微鏡下觀察。

組織病理學診斷: 本法是以傳統的組織病理診斷方法將腦組織製作成石蠟包埋組織切片, 經 H&E 染色於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片中的病理變化來診斷狂犬病, 並以特殊染色 Mann's method 來染腦神經元細胞質內狂犬病特異性之病毒包涵體—奈格利小體 (Negri bodies)。

腦組織切片之製作: 取出一半腦組織固定於 10% 中性福馬林液中 24 至 48 小時 (為求固定良好, 組織之厚度以不超過 1 cm 為原則)。取大腦、小腦及腦幹共六個部位的腦組織, 其重點部位為海馬角, 修整成約 4 mm 的厚度, 放入脫水包埋盒中。依一般例行之病理切片方法, 將組織塊脫水、石蠟浸潤、石蠟包埋等步驟, 製作成 3-5 μm 厚之切片。脫蠟後以 H&E 染色於顯微鏡下觀察各部位腦組織切片的病理變化。

奈格利小體之染色 (Mann's method): 組織切片如常規進行脫蠟後, 於室溫下置於甲基藍染色液 (1% 甲基藍溶液 18 mL + 1% 伊紅溶液 23 mL + 49 mL 蒸餾水, 使用前才配製) 中 24 小時。取出切片水洗再置於 1.5% 氫氧化鈉酒精溶液 (1.5% NaOH in ethanol 1 mL + absolute ethanol 30 mL) 10 分鐘, 使切片染成粉紅色判讀之。

反轉錄聚合酶鏈反應: 利用反轉錄聚合酶鏈反應, 增幅檢體中特異的狂犬病病毒核蛋白基因片段來檢測病毒核酸, 適合實驗室快速診斷狂犬病之用。取約 0.2 g 約米粒大的腦組織置入微量離心管內, 以組織研磨棒將組織搗碎, 加入 1 mL RNA 純化試劑 (TRIzol,

Invitrogen®), 震盪數秒鐘。加入 200 μL 氯仿 (chloroform, Merck®) 振盪 20 秒, 以 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘。收集上清液至另一離心管, 加入等量異丙醇 (isopropanol, Merck®), 室溫感作 10 分鐘。以 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘, 保留核酸沈澱物。加入 1 mL 75% 酒精 12,000 rpm 離心 5 分鐘, 棄上清洗去殘留離子, 加入 100 μL DEPC- H_2O 溶解病毒 RNA, 即可進行反轉錄聚合酶鏈反應。取一 0.2 mL PCR 專用薄壁離心管加入: DEPC- H_2O 32.5 μL 、檢體 RNA 5 μL 、 $10\times$ Prozyme Buffer (Protech) 5 μL 、dNTP (1.25 mM, Invitrogen®) 4 μL 、AMV Reverse transcriptase (Promega) 0.5 μL 、正向引子 1013F (5'-GTAGGATGCTATATGGG-3') 1 μL 、反向引子 1426R

(5'-TTCTTATGAGTCACTCGAATATGTCTTGTTT AG-3') 1 μL 、Rnasin (Promega) 0.5 μL 、Prozyme (Protech) 0.5 μL 。置入循環加熱器上 (Perkin Elmer 9600) 設定時間溫度如下: 40°C , 40 分鐘; 95°C , 2 分鐘; 接下來 94°C , 30 秒; 45°C , 30 秒; 72°C , 30 秒做 35 個循環, 再做 72°C , 7 分鐘。增幅的產物及 100 bp DNA Marker 分別與 6 \times dye 混合後, 放入 2% 電泳膠片, 在裝 TAE 緩衝液之水平式電泳槽內, 以 100 伏特電壓進行電泳。電泳完成後, 將膠片置於電泳膠片照相系統觀察。

老鼠神經胚胎株化細胞分離狂犬病病毒: 老鼠神經胚胎株化細胞 (neuroblastoma cell) 可用來分離狂犬病病毒, 比 BHK 細胞株敏感, 不過不同的狂犬病分離株對此細胞的感受性並不相同。病材乳劑接種細胞株後, 24 個小時即可直接以免疫螢光染色觀察。本實驗與小白鼠接種試驗敏感性相當, 可取而代之, 不僅便宜而且費時較短。

細胞繼代: 將生長良好且無污染之老鼠神經胚胎細胞 (MNA) 25 cm^2 角瓶一只, 抽棄培養液後, 以 $1\times$ PBS [Ca(-), Mg(-)] 5 mL 清洗細胞二次。加注 2 mL 消化液, 置於 37°C 消化約 2 分鐘。抽棄消化液後, 加入 5 mL 細胞培養液並用滴管將細胞沖散成懸浮液。取 0.1 mL 上述細胞懸浮液加入 0.9 mL 0.4% trypan blue 染劑。以細胞計數盤計算細胞數。加入適量細胞培養液, 將細胞濃度調整為 4×10^6 個/mL。

病材乳劑製作：將約 0.2g 重米粒大的腦組織置入微量離心管內，以組織研磨棒搗碎後加入 1 mL 細胞培養液，製成 20%乳劑。置入抗霧氣離心座，以 1,600 rpm 離心 10 分鐘，收集其上清液。

病材接種與感作：取 0.5 mL 乳劑上清液置於 12 × 75 mm 無菌試管，加入 2 mL 濃度 4×10^6 個/mL 細胞懸浮液，震盪混合數秒。置於 37°C 濕式恆溫箱內感作 30 分鐘，每 15 分鐘搖動混合一次。每個病材與細胞感作後加入 12.5 mL 細胞培養液，分裝成 1 個 25 cm² 角瓶和製作 12 片四孔經鐵氟龍被覆處理的玻片，每孔加入 0.2 mL。不鏽鋼淺盤上，鋪上浸濕的擦手紙並壓平將玻片置於其上，96 孔盤的上蓋以 70% isopropanol alcohol 噴灑消毒十分鐘後以紙巾擦乾，做為蓋子蓋住玻片。將角瓶和不鏽鋼淺盤置於 37°C 濕式恆溫箱內。25 cm² 角瓶棄上清後，以消化液消化細胞，最後將細胞濃度調整為 5×10^5 個/mL，如步驟將細胞培養分裝成 1 個 25 cm² 角瓶和製作 12 片四孔經鐵氟龍被覆處理的玻片，置於 37°C 濕式恆溫箱內培養，並以直接免疫螢光標示抗體檢查判定是否含有狂犬病病毒。

酵素連結免疫吸附法檢測血清抗體 (ELISA)：本試驗利用市售商品化酵素連結免疫吸附法檢測套組 (Platelia Rabies kit, 法國 Diagnostics Pasteur 生產) 來篩檢犬血清或血漿中是否存有對狂犬病病毒抗原的 IgG 抗體，其原理是使用被覆狂犬病病毒糖蛋白在 96 孔檢測盤中，加入的犬血清或血漿中若存有抗體，則抗原與抗體可結合並藉由與結合物 (conjugate) 的連結及酵素活化受質 (substrate) 來呈色，測定抗體的濃度。但以此方法並無法鑑別抗體來源自感染或是來自於疫苗免疫所產生的抗體。待測血清或血漿置於水浴槽內，以 56°C 30 分鐘非熱化，取出 96 孔抗原盤，置於室溫中回溫，將待測血清進行 100 倍稀釋並將陽性與陰性對照品進行系列稀釋(取一新的 96 孔盤稀釋盤，加入 150 μ L 樣品稀釋液至 B1~H1、B2~H2、B3~H3 微量孔中，其餘各孔則加入 297 μ L 樣品稀釋液。將 3 μ L 的待測血清由 A4、B4 起依序加至 G12、H12 已有稀釋液之微量孔中，在 A3 微量孔加 3 μ L 陰性對照品，在 A1、A2 微量孔加 3 μ L 陽性對照品。陽性對照二重複稀釋 100 倍後進行 2 倍序列稀釋，陰性對照稀釋 100 倍後進

行 2 倍系列稀釋：由 A1、A2、A3 孔各取 150 μ L 至 B1、B2、B3 孔，混合均勻後取 150 μ L 至 C1、C2、C3 孔，如此依序操作至 H1、H2、H3 後完成)。打開 96 孔抗原盤包裝，取出所需數目 strips。每孔加入 300 μ L 清洗液，然後甩掉盤內清洗液，倒置於毛巾或吸水紙上拍乾，如此重覆清洗二次。以八爪微量分注器將 96 孔稀釋盤內的稀釋檢體與系列稀釋陽性、陰性對照各取 100 μ L 至相對位置之 96 孔抗原盤內，以封盤膜密封，置於 40°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤，甩掉盤內液體，以清洗液清洗三次。配製結合物溶液(1.1 mL 濃縮液加入 9.9 mL 清洗液，可供一盤試驗)，每孔加入 100 μ L 結合物溶液 (conjugate)，以新的封盤膜密封，置於 40°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤，甩掉盤內液體，以清洗液重覆清洗四次。配製受質溶液(20 mL 受質緩衝液加入 2 顆呈色藥錠，可供一盤試驗)，每孔加入 100 μ L 受質溶液，置於室溫暗室下感作 30 分鐘，加入 50 μ L 停止液終止反應。30 分鐘內判讀：呈現黃色判為陽性，或以 ELISA reader 讀取波長 492 nm 之吸光值。將系列稀釋陽性對照之吸光值與其抗體於 X-Y 座標軸上作圖求取抗體力價與吸光值之關係曲線，利用此關係曲線由檢測樣品之吸光值找出對應抗體力價，力價以 U.E.(unit equivalent to the international units)表示，若力價大於 0.5 U.E./mL，判為陽性。

結果

牛海綿狀腦病之診斷及監測：今年共監測 859 頭 24 月齡以上牛腦，檢體採樣來源及各月件數如表 1 所示，來源包括 826 頭自屠宰場逢機採樣檢體 (809 件來自桃園縣屠宰場、4 件屏東縣、13 件金門縣)，3 頭結核病撲殺牛隻 (雲林縣 1 場及彰化縣 2 場，每場次各 1 頭)，6 頭加拿大進口追蹤列管牛隻，1 頭流行熱病例，23 頭高齡衰弱淘汰乳牛，各縣市送檢件數如表 2 所示，檢體皆無牛海綿狀腦病特異病變且未發現異常之普里昂蛋白質，檢驗結果皆為 BSE 陰性，至今台灣仍為牛海綿狀腦病之非疫區。

羊動物傳播性海綿狀腦病之監測：今年共監測 59 頭 24 月齡以上羊腦，檢體取自衰弱淘汰乳羊，經檢驗皆無傳播性海綿狀腦病特異病變且未發現異常之普里昂蛋白質，檢驗結果皆為陰性。

狂犬病監測及狂犬病疫苗調查：今年共檢測 3,204 件血清之狂犬病抗體，陽性率為 45.7 % (1,463/3,204)；其中家犬計 1,380 件，血清抗體陽性率為 58.6 % (809/1,380)；流浪犬計 1,821 件，血清抗體陽性率為 35.9 % (654/1,821)；另有金門縣委託檢測之走私犬 3 件，血清檢測無抗體，檢測成績詳如表 3 所示。各縣市送檢成績如表 4 所示，送檢縣市包括：台北市、新竹市、台中市、南投縣、台南市、高雄市、屏東縣、台東縣及金門縣共九縣市，七縣市中(扣除僅送檢少量血清之縣市：南投縣及新竹市)家犬血清抗體陽性率介於 36.7% ~69.3 %，流浪犬血清抗體陽性率介於 30.4% ~51.6 %。此外，在犬腦病原監測方面，送檢流浪犬犬腦包括台北市 7 件、台中市 12 件、台南市 12 件、屏東縣 12 件、台東縣 16 件與金門縣 20 件，共 79 件；台北市送檢疑似出現神經症狀之疑似病例 1 件，台北縣及雲林縣送檢疑似中毒病例各 1 件。另有金門縣委託檢測之走私犬 2 件，台北市及台北縣送檢疑似腎衰竭病例共 6 件，狂犬病犬腦抗原監測件數如表 5 所示，應用直接免疫螢光標示抗體檢查法、組織病理學診斷法及反轉錄聚合 鏈反應檢測狂犬病病變及病毒抗原，結果皆為陰性，迄今我國仍為狂犬病之非疫區。

討論

目前 TSE 或 prion 疾病診斷以 PrP^{Sc} 為依據，除了羊搔癢症能採取眼瞬膜及扁桃腺進行活體診斷外，其他種類疾病僅能於動物死後應用免疫化學方式偵測之，雖然後續仍有許多檢驗技術與套組被開發出來，但大多仍處於研究階段未能普遍地被應用於診斷。例如使用基因轉殖鼠來進行人工動物接種試驗，可大幅縮短原先接種小白鼠所需的 292 天潛伏期。但因實驗動物的飼養較費人力，且需在符合生物安全三級的陰壓動物舍飼養，所以目前仍只應用於研究領域。另外在腦脊髓液或血液的檢驗方面，由 BSE 的確診病例發現可偵測出 apolipoprotein E、14-3-3、S-100 等蛋白質，但缺乏特異性尚無法應用於臨床診斷。另有學者藉由電子化學分析法 (electrochemical analysis) 偵測感染 prion 動物尿液中的代謝物，但是這種方法的敏感性和特異性較低，目前仍不建議用作

單一的診斷法。此外由於新的檢驗方法缺乏真實之黃金診斷標準 (true gold standard)，且會隨著潛伏期的不同對前述檢驗方法的敏感性也有所不同，故仍需再評估其診斷實用性。根據世界動物衛生組織的建議，在發生率低的地區或是非疫區的監控仍是以組織病理學診斷與免疫組織化學染色為主。

日本於 2001 年 9 月開始發現亞洲地區首宗 BSE 病例，至今年為止已有 14 個病例。根據英國非官方的報告 (海關出口統計資料)，指出英國曾在 1989 至 1996 年間輸入台灣 4,598 噸的飼料，其中可能包括肉骨粉，而且目前全世界已有二十三個國家 (地區) 為 BSE 疫區，所以為防範 BSE 入侵我國，我國應落實並加強各種相關防範措施，尤其是加強檢疫措施、防範走私、加強監測工作之執行、加強反芻獸飼料之使用管制及其宣導等。

狂犬病監測：本所自 1998 年開始進行犬隻狂犬病血清抗體調查，各年之血清抗體檢測結果詳如表 6，1998-2004 年共檢測家犬 9,253 隻，血清抗體陽性率平均為 54.9%，各年之家犬抗體陽性率分別 64.0%、57.6%、48.7%、49.9%、40.8%、61.3%、58.6%；1998-2004 年共檢測流浪犬 10,283 隻，血清抗體陽性率平均為 32.4%，各年之流浪犬抗體陽性率分別 18.6%、46.6%、35.5%、21.7%、20.7%、41.1%、35.9%，可見狂犬病疫苗抗體陽性率並不高，顯示國內犬隻狂犬病預防注射仍有加強推廣之必要。

狂犬病病毒抗原偵測：針對疑似病犬及流浪犬，至今共檢測 292 例犬腦組織，詳如表 7，結果皆為陰性。狂犬病的發生與流行，除了犬與貓等主要傳播動物，野生肉食動物及蝙蝠間傳播也扮演著某種角色，甚至拉丁美洲常發生吸血蝙蝠傳染家畜之病例，此外據美國疾病管制局資料顯示美國自 1990 至 2000 年共發生 32 件人類病例，其中 24 件(佔 75%)係被蝙蝠攜帶之病毒感染，文獻指出歐洲地區自 1977 年至 2003 年發生四件由蝙蝠攜帶之狂犬病病毒造成之人類死亡病例，加拿大於 2000 年發生一件類似死亡病例，皆突顯出在歐美已開發國家中蝙蝠將病毒傳播至人類之危險性[12, 13]，美國於 2003 年發生一人類死亡病例，且病患於就診 6 週前被蝙蝠咬傷[CDC website, 2003]，雖然在美國發

生之絕大多數病例(22 件, 佔 92%)缺乏被蝙蝠咬傷之病史, 但美國 CDC 於處理類似蝙蝠傳染病例時亦給予患者及時的處理與治療。除了經傷口感染途徑外, 狂犬病病毒可經由空氣傳播, 如處於蝙蝠群居的山洞中時, 可能吸入蝙蝠糞尿中病毒而感染, Amasino 等報告一件貓隻狂犬病病例, 檢測結果係由食蟲目蝙蝠所攜帶病毒所引起, 作者推測該病例可能經由空氣途徑而受感染[5], 綜合上述文獻, 顯示蝙蝠對動物及人類狂犬病的傳播所扮演角色, 台灣屬海島國家, 擁有獨特生態環境, 境內保有蝙蝠種類中並無吸血蝙蝠, 除了台灣狐蝠外多為食蟲目蝙蝠[農委會網站], 然而亦須對國內的蝙蝠進行調查, 以了解是否攜帶狂

犬病病毒屬之病毒, 供作狂犬病防治之參考。

目前臺灣為狂犬病非疫區, 但鄰近的國家除日本之外均為疫區, 且近年來國際交通往來密切, 非法走私動物及其產品之行為頻繁防不勝防。此外, 我國與中國大陸兩岸開放小三通之後, 交通更是日趨頻繁, 使狂犬病入侵我國之風險大為提高, 根據世界衛生組織之資料, 大陸地區每年均有數百人死於狂犬病, 因此防範狂犬病入侵的工作應積極地進行。應藉由宣導與教育強化全民對此疾病之認識, 呼籲其定期對自己飼養之家犬注射狂犬病疫苗, 嚴格控管流浪狗且減少其族群之擴張。使 80%以上畜犬具有抵抗狂犬病病毒感染之能力, 如此方能免於狂犬病入侵之威脅。

表 1. 2004 年牛海綿狀腦病監測檢體來源

月 份 來 源	1-3 月	4-6 月	7-9 月	10-12 月	合計
屠宰場	244	169	220	193	826
結核病撲殺場	2	1	0	0	3
送檢病例	0	1 ^a	15 ^b	14 ^c	30
合 計	246	171	235	207	859

備註:

a: 加拿大進口衰弱追蹤列管牛隻 1 件(細菌性敗血症病例)

b: 高齡淘汰乳牛 15 件

c: 包括加拿大進口衰弱追蹤列管牛隻 5 件(流行熱病例 1 件、關節炎 1 件、蹄炎 2 件、疑似瘤胃異位 1 件)、高齡淘汰乳牛 8 件及流行熱病例 1 件

表 2. 2004 年牛海綿狀腦病監測檢體之地區分佈

區 別	縣 市	牛腦件數
北 區	台 北 縣	1
	桃 園 縣	809
	新 竹 縣	1
	苗 栗 縣	6
中 區	彰 化 縣	12
	雲 林 縣	8
南 區	台 南 縣	2
	台 東 縣	1
	屏 東 縣	6
離 島	金 門 縣	13
合 計		859

表 3. 2004 犬隻狂犬病血清抗體檢測結果

犬 別	數 量		
	陽性數	檢測數	陽性率
家 犬	809	1,380	58.6%
流 浪 犬	654	1,821	35.9%
走 私 犬	0	3	0%
合 計	1,463	3,204	45.7%

表 4. 2004 各縣市犬隻狂犬病血清抗體檢測結果

縣市別	家 犬		流 浪 犬	
	陽性數/檢測數	陽性率	陽性數/檢測數	陽性率
台北市	136/228	59.6%	73/240	30.4%
台中市	207/334	62.0%	79/252	31.3%
新竹市	2/2	100%	0	0
南投縣	0	0	0/2	0%
台南市	191/240	79.6%	86/243	35.4%
高雄市	24/41	58.5%	129/250	51.6%
屏東縣	88/240	36.7%	74/243	30.5%
台東縣	57/145	39.3%	98/241	40.7%
金門縣	104/150	69.3%	115/350	32.9%
合 計	809/1,380	58.6%	654/1,821	35.9%

表 5. 2004 年狂犬病病原監測結果

縣市別 \ 月份													累 計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
台北市	0	1 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^b	0	0	0	0	0	0	7 ^e	13
台北縣	0	0	1 ^a	0	0	1 ^c	0	0	0	0	0	0	2
台中市	0	0	0	0	0	5 ^e	0	0	0	0	7 ^e	0	12
雲林縣	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^c	1
台南市	0	0	0	0	0	0	6 ^e	0	0	0	6 ^e	0	12
高雄市	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
屏東縣	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12 ^e	12
台東縣	0	0	0	0	0	1 ^e	0	0	0	0	0	15 ^e	16
金門縣	0	0	2 ^d	6 ^e	2 ^e	2 ^e	2 ^e	0	2 ^e	2 ^e	4 ^e	0	22
合 計	0	1	5	8	3	9	8	0	2	2	17	35	90

備註：

共檢驗 90 例犬腦組織，包括 1 例犬瘟熱病例、2 例疑似中毒病例、6 例腎衰竭病例、2 例走私犬及 79 例流浪犬腦組織，共製備 270 件壓片及腦組織切片，組織切片及免疫螢光染色結果皆無狂犬病特徵性病變。

a: 腎衰竭病例

b: 犬瘟熱病例

c: 疑似中毒病例

d: 走私犬

e: 流浪犬

表 6. 1998-2004 年犬隻狂犬病血清抗體檢測結果

年度	家 犬		流 浪 犬	
	陽性數/檢測數	陽性率	陽性數/檢測數	陽性率
1998	1,167/1,823	64.0%	30/161	18.6%
1999	625/1,085	57.6%	585/1,256	46.6%
2000	266/546	48.7%	386/1,088	35.5%
2001	450/902	49.9%	323/1,489	21.7%
2002	783/1,918	40.8%	491/2,369	20.7%
2003	980/1,599	61.3%	863/2,099	41.1%
2004	809/1,380	58.6%	654/1,821	35.9%
合 計	5,080/9,253	54.9%	3,332/10,283	32.4%

表 7. 1999 年至 2002 年犬腦組織狂犬病抗原檢驗結果

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	合計
家犬	29	2	27	3	6	9	76
流浪犬	5	10	1	53	68	79	216
合計	34	12	28	56	74	88	292

參考文獻

1. 李淑慧、丁履紉。研習狂犬病診斷技術。行政院農業委員會所屬各機關出國報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2000。
2. 李淑慧、張國慧。研習牛海綿狀腦病診斷技術。行政院農業委員會所屬各機關出國報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2001。
3. 張國慧、李淑慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺。牛海綿狀腦病實驗室診斷技術之建立與監測。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告年報 37: 1-7, 2001。
4. 台灣蝙蝠的現況與種類介紹。行政院農業委員會網站。 <http://www.coa.gov.tw/>
5. Amasino CF, Gury Dohmen F, de Gaetano J, Mena Segura C, Palazzolo A. A case of bat rabies in a cat in the province of Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech* 22(3): 1021-7, 2003.
6. Balter M. Origins of BSE. Intriguing clues to a scrapie-mad cow link. *Science* 292: 827-9, 2001.
7. Barlow RM, Middleton DJ. Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 126: 111-112, 1990.
8. Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Stack M, Moser M, Oesch B, Kubler E. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrPSc in brain homogenate. *J Virol Methods* 101: 79-84, 2002.
9. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
10. Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 125: 64-70, 2001.
11. Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandeveld M, Heim D. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 672, 1999.
12. Deshaies D, Pilon PA, Valiquette L, Carsley J. A public health intervention at the time of a case of rabies in Quebec. *Can J Public Health* 95(2):138-41, 2004.
13. Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, McElhinney LM, Hutson AM. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. *Epidemiol Infect* 131(3):1029-39, 2003.
14. Graber HU, Meyer RK, Fatzer R, Vandeveld M, Zurbriggen A. In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Med Assoc* 42: 453-459, 1995.
15. Green AJE, Jackman R, Marshall TA, Thompson EJ. Increased S-100b in the cerebrospinal fluid of some cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 107-109, 1999.
16. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450, 1997.
17. Human Death Associated with Bat Rabies—California, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 53(2):33-5, 2004. CDC website. <http://www.cdc.gov/>
18. Jones V, Martin TC, Keyes P, Dawson M. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 139: 360-363, 1996.
19. Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 1250: 187-93, 1998.

20. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. World Health Organization, Laboratory techniques in rabies. pp. 157-174, 1996.
21. Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandeveld M, Moser M. Application of Prionics® Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol, Supp* 16: 189-195, 2000.
22. Office International des Epizooties (OIE). Bovine Spongiform Encephalopathy. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Fourth Edition. Part 2, Chapter 2.3.13*, 2000.
23. Office International des Epizooties (OIE). Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy. In: *Terrestrial Animal Health Code. Part 3, Appendix 3.8.4*, 2003.
24. Prusiner SB, Kingsbury DT. Prions-infectious pathogens causing the spongiform encephalopathies. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol* 1: 181-200, 1985.
25. Robey WG, Jackson R, Walter RL, Brackett CA, Harrington CA, Killian WR. Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle. *Vet Rec* 143: 50-51, 1998.
26. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathologica* 98: 437-443, 1999.
27. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 276: 31479-82, 2001.
28. Texas department of Health. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control, Rabies procedure Manual, 1996.
29. Wallis M, Velleca BS, Francis TF. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control, Laboratory Methods for detecting Rabies, 1981.
30. Wells GAH, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nucleic of the medulla oblongata. *Vet Rec* 125: 521-524, 1989.

Surveillance of Transmissible Spongiform Encephalopathy and Rabies in 2004

Shu-Hwae LEE, Kwok-Rong TSAI, Kuo-Hui CHANG, Jen-Chieh CHANG, Che-tun HUNG,
Lu-Jen TING , Wastson H. T. SUNG

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

We have applied histopathology, immunohistochemistry, Western immunoblot assay, and enzyme-linked immunosorbent assay techniques in the continuous surveillance program of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Among the 859 cattle brains, 826 brains were collected randomly from the abattoirs, 3 from the M. tuberculosis-contaminated farms, 6 from the sick cows imported from Canada, 1 from the bovine ephemeral fever virus infected cattle and 23 from the culling old cattle in Taiwan in 2004. Cattle developed central nervous signs or showed other symptoms were also included. All of the brains were negative. Additionally, histopathological observation and direct immunofluorescent antibody were also applied to examine 1 rabies-suspected case with nervous symptom and 79 brain tissues of stray dogs in 2004. Rabies viral antigens and typical lesion were not detected in all tissues indicating free status of rabies in Taiwan. On the other hand, 3,204 sera samples including 1,380 samples from domestic dogs and 1,821 samples from stray dogs were examined by the enzyme-linked immunosorbent assay. Results showed that the sero-positive rate of domestic and stray dogs were 58.6% (809/1,380) and 35.9% (654/1,821), respectively.

Key words: TSE, rabies, surveillance