

山羊痘之診斷

丁履紉 本所疫學研究組

山羊痘 (goat pox) 為病毒性疾病，主要的病徵為發燒、全身性丘疹膿疱、結節、水疱（較少見）、肺臟病變，甚至死亡。山羊痘、綿羊痘 (sheep pox) 與牛結節疹 (lumpy skin disease) 皆屬於痘病毒科 (Poxviridae) 羊痘病毒屬 (Capripoxvirus)，彼此間有交叉保護作用。山羊痘和綿羊痘病毒多數毒株具有種別感染特異性，但有些毒株對綿羊和山羊皆有感受性。本病藉動物直接接觸或與污染物間接接觸而傳播。病原對酸不穩定，但對乾燥有抵抗力。

羊痘流行於非洲北部的赤道區、中東、土耳其、伊朗、阿富汗、巴基斯坦、印度、尼泊爾、中國大陸和孟加拉等地。2005 年越南首次發生疫情，2008 年再次爆發疫情並成為地方性疾病；2008 年及 2009 年於蒙古接連發生疫情，2008 年希臘發生疫情，2009 年哈薩克和亞塞拜然皆陸續傳出疫情，2008 年臺灣首次發生，2010 年再次傳出疫情。

羊隻感染羊痘後，初期在口腔、鼻腔和眼睛的黏膜會出血和發炎，數天後皮膚可見紅斑接著出現丘疹樣痘病變。中度感染病灶集中在皮膚無毛區。重度感染病變遍及口腔、呼吸道和腹腔，容易引發二次感染而死亡。病徵的表現，依病毒株的毒力、羊品系和動物個體的免疫力不同而有輕重之差異。感染動物如果存活，病灶 3-4 週可癒合。

病史及臨床肉眼病灶懷疑本病，需用實驗室方法進一步確診。本病的實驗室診斷以電子顯微鏡檢查法和聚合酶鏈反應試驗最為快速。欲分離羊痘病毒，必須將痘瘡組織接種於初代綿羊、山羊或牛來源之細胞，14 天以上才能增殖成功。瓊脂凝膠免疫擴散試驗 (Agar gel immunodiffusion; AGID) 雖可用來診斷羊痘，但敏感性低而且與副痘病毒

(parapoxvirus)之羊接觸傳染性化膿性口炎(contagious pustular dermatitis; 又簡稱為 orf)，容易產生交叉反應而誤診，故不再推薦。

依世界動物衛生組織(OIE)陸生動物診斷試驗與疫苗手冊2010年版第2.7.14之內容，綿羊痘和山羊痘診斷包括有病原鑑定和血清學檢查，其方法如下：

一、病原鑑定

(一) 樣本採集、遞送和前處理

病毒分離和抗原檢測的試材以皮膚丘疹、肺部病變或淋巴結為佳，若病畜眼、鼻有大量分泌物者，以無菌棉棒採集鼻腔拭子，放置於無菌離心管內（不需加保存液），亦可做為病毒分離之樣材。欲分離病毒之樣材採樣時間以出現臨床症狀的1週內，抗體尚未生成前較易分離。聚合酶鏈反應(PCR)檢測因為不會受抗體影響，故不受限。病毒血症期間，也就是出現全身性病變開始4天內，可以採集添加乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)抗凝劑的血液取白血球層，來分離病毒。組織病理學檢查的樣本，採集後立即放入10倍體積量的10%中性福馬林液中保存，福馬林組織樣材室溫運輸即可，切不可冷凍。病毒分離用的血液樣本應添加抗凝血劑、採集後立即放在冰上，保持在4℃，不可凍結或放置室溫，於兩天內儘速送至實驗室。用於病毒分離和PCR檢測之組織塊和乾痂皮，存放於4℃或-20℃並後送實驗室（詳如表1）。

表1、山羊痘診斷不同檢驗項目所需之試材及保存運送條件

檢驗項目	試材	保存溫度	運送條件	備註
病毒分離	皮膚丘疹、肺、淋巴結、 鼻腔拭子	4℃或-20℃	4℃或-20℃	兩天內儘速後送至實驗室
	抗凝血	4℃	4℃	不可凍結，兩天內儘速後送至實驗室
PCR檢測	皮膚丘疹、肺、 淋巴結、鼻腔拭子	4℃或-20℃	4℃或-20℃	
	抗凝血	4℃	4℃	不可凍結
抗體檢測	血清	4℃或-20℃	4℃或-20℃	
組織病理學 檢查	皮膚丘疹、肺、淋巴結	常溫	常溫	放入10倍體積量的 10%中性福馬林液，不 可凍結

(二) 聚合酶鏈反應法 (polymerase chain reaction, PCR)

針對山羊痘病毒之吸附蛋白基因 (attachment protein gene) 和病毒融合蛋白基因 (fusion protein gene)，設計之引子對，應用傳統或即時聚合酶鏈反應可以增幅出檢體中特異羊痘病毒的核酸片段，用以診斷本病。此法適用於各種新鮮或經福馬林固定之組織。目前以血清學無法區分羊痘病毒屬中牛、綿羊或山羊的病毒株，但可以利用各病毒株之核酸序列差異或分子演化性狀來辨識。

聚合酶鏈反應法試驗方法是採皮膚病變組織、肺臟或淋巴結，先以細胞培養液混合研磨成 10% (W/V) 乳劑。鼻腔拭子加入 1 mL 細胞培養液，以震盪器混合均勻後靜置備用。取 0.2mL 臟器乳劑上清液或鼻腔拭子混合液或血液，利用 MagNA Pure Compact 自動核酸萃取機，萃取病毒核酸供為 DNA 增幅。以綿羊/山羊痘病毒特異引子，(序列參考 JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 77,1999,75-79)。其順向引子序列為 F452 5'-AGAAACGAGGTCTCGAAGCA，逆向引子序列為 R740 5'-GGAGGTTGCTGGAAATGTGT，產物大小為 289bp。循環加熱器設定時間和溫度反應條件如下：94°C 5 分鐘；94°C 30 秒；55°C 30 秒；72°C 30 秒，38 個循環；72°C 7 分鐘。最後產物以 1% 電泳膠片分析。陽性樣品及陽性對照組會出現一條分子量 289bp 之 PCR 產物，陰性樣品及陰性對照則無產物出現。

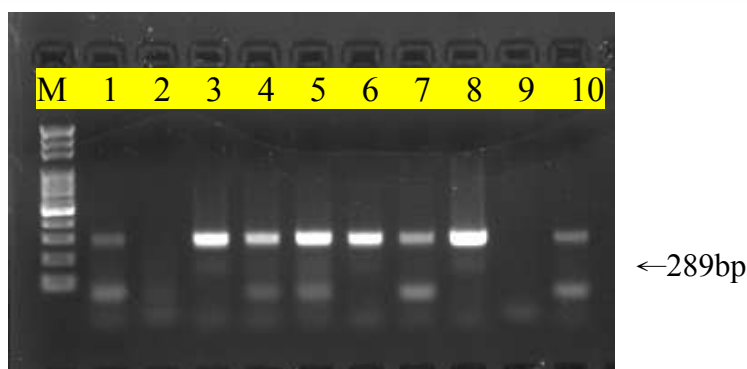


圖 1、以羊痘 PCR 試驗篩檢疑罹羊痘病材結果。

1. 痘瘡 1；2. 痘瘡 2；3. 痘瘡 3；4. 痘瘡 4；5. 痘瘡 5；6. 鼻拭 1；7. 鼻拭 2；8. 鼻拭 3；9. 陰性對照；10. 山羊痘陽性對照。羊痘陽性病材會出現 289bp 產物（痘瘡 1、3、4、5；鼻拭 1、鼻拭 2、鼻拭 3；陽性對照），陰性樣本則無（痘瘡 2；陰性對照）。

(三) 電子顯微鏡檢查法

電子顯微鏡負染色檢查法是區別羊痘（capripoxvirus）及羊接觸傳染性化膿性口炎；又稱為 orf（contagious pustular dermatitis）最佳工具。羊痘病毒與副痘病毒（parapoxvirus）在形態、特徵和大小差異很大，很容易區別。病畜皮膚丘疹、肺臟病灶或淋巴結節病材製成 10% 乳劑，離心收集上清液，上清液經超高速離心後，沈澱物溶解於蒸餾水中，加入等體積之 2 % 磷鎢酸染色液（PTA）混合，PTA 為重金屬鹽類染劑電子束不易穿透染色後之檢體，滴在鍍上碳膜或加上塑膠支持膜（如 Formvar 或 Colloidion 支持膜）的銅網片（grid）數秒鐘後，以濾紙吸乾即可以電子顯微鏡觀察。檢體染色後，其中病毒顆粒及未受染劑滲入的部分，容易被電子束穿透故透光性較高而成為白色，吸附染劑的背景部分透光性差而成為黑色，故鏡檢時呈現黑白對比的影像，藉以觀察病毒的形態特徵及大小予以判定。山羊痘為羊痘病毒屬（Capripoxvirus）如圖 2a，病毒的型態為磚形，病毒顆粒大小為 290×270 nm，病毒表面具有管狀小體構成絲狀結構。羊隻常見的傳染性化膿性皮膚炎的病原屬於副痘病毒，其型態呈長橢圓形，病毒顆粒較小寬約 80 nm，長約 150~200 nm，病毒表面具有絲狀結構排列成規則之螺旋形，與痘病毒容易區別（如圖 2b）。

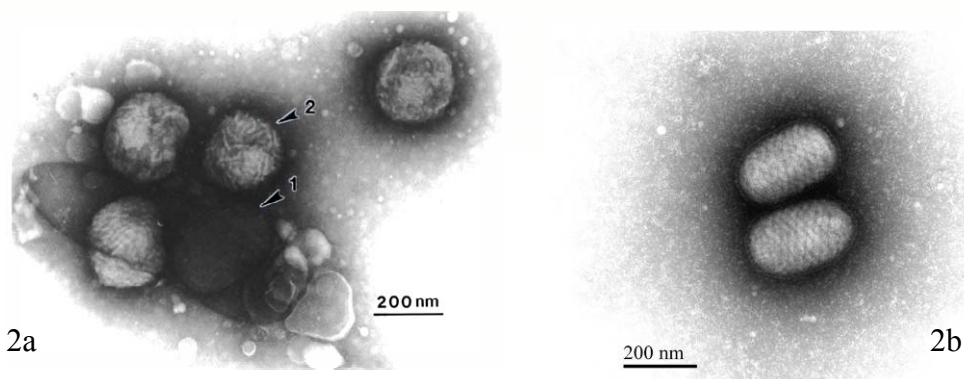


圖 2、山羊痘病毒（圖 2a）和傳染性化膿性皮膚炎（圖 2b）在電子顯微鏡負染色法鏡檢下形態。山羊痘病毒的型態為磚形，病毒顆粒大小為 290×270 nm，病毒表面具有管狀小體構成絲狀結構。傳染性化膿性皮膚炎病毒，其型態呈長橢圓形，病毒顆粒較小寬約 80 nm，長約 150~200 nm，病毒表面具有絲狀結構排列成規則之螺旋形。

(四) 分離病毒

牛、綿羊或山羊來源的細胞皆可用來分離或增殖山羊痘病毒，其中以羔羊睪丸或腎之初代細胞或細胞株敏感性比較好，綿羊來源的細胞又比山羊佳。病毒分離方法如下：1 mL 白血球細胞懸浮液或 1 mL 檢體 10% (W/V) 組織乳劑上清液接種 25 cm² 小角瓶，瓶內細胞層約九成滿，接種之上清液與細胞於 37 °C 恆溫箱中感作 1 小時，讓病毒吸附於細胞。將瓶內培養液吸除，加入少量細胞培養液輕輕洗去雜質，最後加入含 2% 胎牛血清的細胞維持液，置入 37 °C 恆溫箱中培養。顯微鏡下每日觀察是否有細胞病變作用，約 7-14 天才會顯現病毒增殖的特殊的細胞病變，感染羊痘病毒的細胞呈現細胞膜收縮，細胞圓形化，核染色質著邊現象，並不會有細胞融合病變。細胞感染後最快 4 天可觀察到小區域細胞病變，接下來 4-6 天病變區範圍漸漸擴大至整個細胞層（如圖 3）。若 7 天後無 CPE，細胞反覆冷凍、解凍，取上清液再接種新的單層細胞。若 3 次繼代後第 7 天仍無 CPE，病材樣品認定為陰性。有些羊痘病毒株經馴化後可增殖於非洲綠猴腎臟細胞（Vero cells），但初次分離並不建議用 Vero 細胞。出現 CPE 的細胞，取上清液以電子顯微鏡觀察是否有羊痘病毒顆粒，或以山羊痘陽性血清進行間接螢光染色，觀察細胞質是否出現特異螢光。

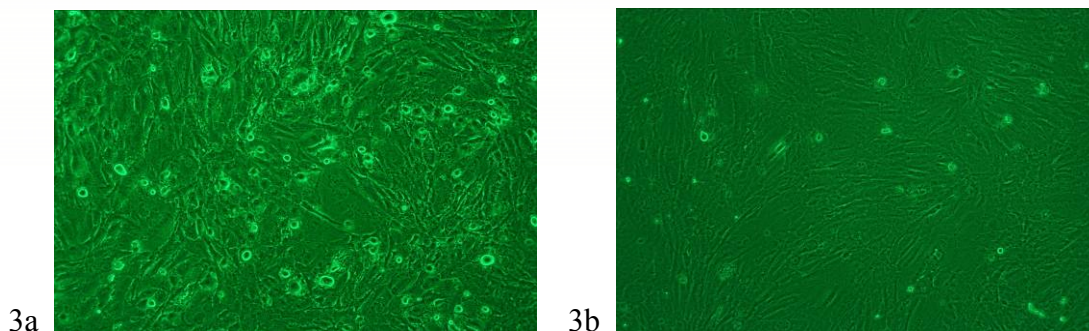


圖 3、山羊痘丘疹乳劑上清液接種於山羊胚睪丸細胞，可見細胞圓形化和脫落等細胞病變（圖 3a），圖 3b 為正常山羊胚睪丸細胞。

(五) 動物接種

製備感染山羊痘之羊組織乳劑上清液，皮內接種於感受性較強之羔羊品種，每日仔細觀察，可發現感染羊痘之皮膚特徵性病變。

二、血清學檢查

(一) 病毒中和指數試驗 (Neutralisation index)

由於羊痘病毒於細胞組織培養時定量結果不穩定，100 TCID₅₀的病毒量稀釋倍數多變，造成抗體力價檢測結果不一致，故推薦用病毒中和指數試驗 (neutralisation index) 替代，但缺點是所使用的血清量較多，羊痘標準株力價需超過 log 6.0 TCID₅₀/mL。試驗方法如下：待測血清、陽性和陰性對照血清，先以Eagle's/HEPES細胞培養液5倍稀釋，經56 °C 30分鐘進行非働化處理。每個血清樣品至少作二重覆 (duplicate) 試驗，取50μL待測血清加入96孔細胞培養盤1、2欄的A-H列，第2個血清加入3、4欄的A-H列，第3個血清加入5、6欄的A-H列，陽性對照血清加入7、8欄的A-H列，陰性對照血清加入9、10欄的A-H列，11、12欄的A-H列加入Eagle's/HEPES。羊痘標準株力價需超過log 6.0 TCID₅₀/mL。病毒以Eagle's/HEPES連續稀釋成log 5.0；4.0；3.5；3.0；2.5；2.0；1.5 TCID₅₀/mL。從G列開始依序加入50μL力價較低稀釋階的病毒液 (log 1.5 TCID₅₀/mL)，力價較高稀釋階加入A列 (log 5.0 TCID₅₀/mL)。培養盤置入37°C 恆溫箱感作1小時。初代胚羊睪丸細胞，經繼代後以2%FBS Eagles's/HEPES培養液製成細胞懸浮液濃度為10⁵ cell/mL，細胞盤1至10欄每孔加入100μL細胞液，11、12欄為培養液對照欄不需加細胞液。H列則為血清毒性對照欄。培養盤置入37°C、5% CO₂培養箱培養9天。

判讀結果以待測血清無出現CPE的最大病毒稀釋階的log值減去陰性對照無出現CPE的最大病毒稀釋階血清log值等於中和指數 (neutralisation index)。中和指數≥1.5判定血清抗體為陽性。由於羊痘病毒主要是激活宿主的細胞免疫反應故抗體反應較不顯著，所以疫苗免疫後中和抗體力價都不會太高，較低的血清抗體力價並不表示這些血清沒有保護效力。

(二) 瓊脂凝膠免疫擴散 (Agar gel immunodiffusion)

AGID試驗並不推薦做羊痘感染血清學診斷之用，因為會與需區別診斷之orf有交叉反應，得到假陽性結果。

(三) 間接螢光抗體染色試驗 (Indirect fluorescent antibody test)

利用可掀除式培養玻片 (culture slides) 或96孔細胞培養盤培養感染山羊痘病毒

的細胞製備抗原盤，可用於間接螢光抗體試驗，檢測血清中山羊痘抗體。首先感染和未感染山羊痘病毒的初代胚羊睪丸細胞，固定在-20 °C 丙酮中10分鐘，接著將待測血清和山羊痘陽性和陰性對照血清先以PBS溶液稀釋5倍，分別加入細胞抗原盤內感作30分鐘後以PBS洗去未鍵結的物質，再加入抗山羊IgG螢光標識抗體染色（rabbit anti-goat IgG-FITC），於螢光顯微鏡下觀察，血清樣本為陽性者可見細胞質呈現螢光，陰性抗體無出現螢光（如圖4）。間接螢光抗體染色試驗可能與口瘡、牛丘疹性口炎病毒和其他 poxviruses發生交叉反應。

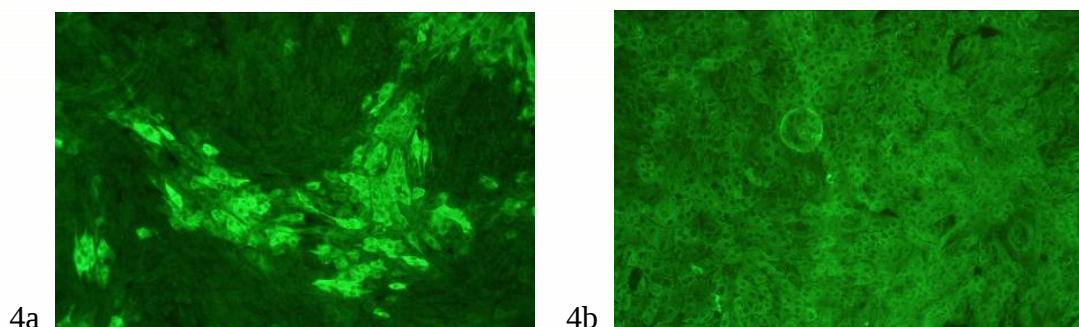


圖 4、山羊痘血清抗體間接螢光抗體染色試驗

自製之山羊痘抗原盤以陽性山羊痘羊血清感作後加入抗山羊 IG 螢光標示抗原於螢光顯微鏡下觀察有可部份區域細胞質呈現螢光圖 4a、圖 4b 為山羊痘陰性血清並無螢光。

goatpox