

# 豬鐵士古病毒致病機轉與疫苗研發之探討

報告人：邱淑君 助理研究員（製劑研究組）

## 壹、緒言

2000 年自南投縣送檢病例分離出豬鐵士古病毒，發病豬隻呈下痢及神經症狀，同年起台灣各地陸續發現豬隻感染鐵士古病，困擾國內豬隻飼養業，鐵士古病不但具有高度傳染性與高死亡率，病豬具神經症狀，且恢復豬隻有消瘦、生長遲緩之現象。因此養豬場一旦發生此病，常造成仔豬之低育成率重大經濟損失。本病於國內目前並無疫苗可供使用。本計畫擬選擇未具豬鐵士古病抗體之仔豬，進行鐵士古病毒攻擊試驗，經由病理檢測、病毒分布探討其致病機轉，擬進一步研究病毒蛋白之抗原性及免疫原性，作為開發活毒疫苗及次單位疫苗之可能性，以達預防及控制本病之發生。

鐵縣病 (Teschén disease)，係毒力最強的鐵士古病毒 (PTV-1) 造成，所有豬齡豬隻都會感染，感染率與死亡率均高。早期症狀包括有厭食、精神不振和發熱。隨後運動失調、站姿不正和躺臥。也可能顯現後弓反張、抽搐和昏迷。數日內即告死亡。偶有耐過者，但會有麻痺之後遺症發生。豬腸病毒和鐵士古病毒，昔日統稱為豬腸病毒。大部份的感染豬均無明顯臨床症狀產生，但有些較強病毒株則會引起腦脊髓灰質炎、母豬生殖系統疾病、腸道疾病和肺炎。豬鐵士古和腸病毒只感染豬，主要經口攝入污染糞便而感染，但亦可藉污染機械而間接傳播。其中以豬鐵士古病毒 1 型 (PTV-1) 最具病原性，會引起豬隻之鐵縣和鐵芬疾病，故又稱之為鐵縣-鐵芬病毒 (Teschén-Talfan virus; TTV)。豬鐵士古病毒 1 型，強毒株主要分佈在中歐及部份非洲地區，而弱毒株及其他血清型之鐵士古和腸病毒則遍佈全世界，包括歐洲、北美洲和澳洲，尤其是密集式養豬場更常發生，甚至有兩種以上血清型病毒同時存在於同一豬場。目前台灣從送檢豬隻病材常可分離出豬鐵士古病毒 1 型和豬腸病毒 8 型。

研究病毒蛋白之抗原性及免疫原性，作為開發死毒疫苗、活毒疫苗及次單位疫苗之可能性，以達預防及控制本病之發生。

## 貳、材料與方法

### 病毒毒力及抗體力價檢測：

將篩檢後之台灣分離株進行豬隻接種，觀察病毒毒力，並檢測是否產生良好之抗體力價。共分成三組：PTV 抗體陽性組、PTV 抗體陰性組、對照組。以觀測台灣株之毒力及其病毒分佈，並檢測抗體產生以評估是否適合成為疫苗株。

病毒株：

2000 年臺南分離株。

PK-15 細胞株：

為豬腎臟株化細胞，Eagle's minimum essential medium(EMEM)培養基加入 5% 胎牛血清，適量之  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  及抗黴劑之培養液培養之。

實驗豬隻：

PTV 抗體陽性組

7 頭。

PTV 抗體陰性組

3 月齡 SPF 仔豬共 7 頭，PTV 抗體陰性、PCV2 抗體陰性。

實驗組：6 頭

對照組：1 頭

病毒接種方式

實驗組：將豬鐵士古病毒(PTV) 2 ml (病毒力價  $10^{6.3}/\text{ml}$  TCID<sub>50</sub>)經由口鼻接種。

對照組：口鼻接種 2 ml 之磷酸緩衝食鹽水。

豬隻觀察：

豬隻每日早晚紀錄體溫，觀察臨床症狀。

採材

抗體陽性組病毒接種後第 28 日犧牲，觀察肉眼病變，每頭採取血液、嗅球、大腦、小腦、腦幹、頸椎脊髓、胸椎脊髓、腰椎脊髓、扁桃腺、氣管、肺臟、心臟、肝臟、胰臟、腎臟、下顎淋巴結、小腸、小腸淋巴結、空腸、空腸淋巴結、結腸、結腸淋巴結、直腸，鼠蹊淋巴結等並分 2 部分處理，一份磨碎供做病毒分離 RT-PCR 檢測用，另一部分福馬林固定做病理檢測用。對照組採血檢測中和抗體力價。

抗體陰性組病毒接種後第 15、50 日犧牲各犧牲三頭，觀察肉眼病變，每頭採取血液、嗅球、大腦、小腦、腦幹、頸椎脊髓、胸椎脊髓、腰椎脊髓、扁桃腺、氣管、肺臟、心臟、肝臟、胰臟、腎臟、下顎淋巴結、小腸、小腸淋巴結、空腸、空腸淋巴結、結腸、結腸淋巴結、直腸，鼠蹊淋巴結等並分 2 部分處理，一份磨碎供做病毒分離 RT-PCR 檢測用，另一部分福馬林固定做病理檢測用。對照

組採血檢測中和抗體力價。

#### 樣材處理

將採取樣材秤重後加入 MEM 磨碎做成 10 倍乳劑，並經 6000g 離心 30 分鐘，取上清液，分成二份，一份再經  $0.22\ \mu$  過濾後接種至 PK-15 Cells，持續繼代三代觀測細胞病變效應(CPE)並分離病毒，另一份利用 RT-PCR 方式偵測病毒特異性片段。

#### 血清抗體檢測

豬隻每日採血分離血清，採集之血清利用中和抗體檢測抗體力價檢測抗體上升情況。

### 參、結果與討論

#### 體溫測量：

實驗組豬隻接種 PTV 後第 2 日體溫逐漸上升，至第 14 天豬隻體溫可達  $40.5^{\circ}\text{C}$ ，之後體溫開始下降。

#### 臨床症狀：

實驗組豬隻接種後出現發熱反應( $40\sim 40.5^{\circ}\text{C}$ )，熱反應可持續至第 14 日，厭食、精神沉鬱及下痢之臨床症狀。

#### 血液學檢測：

白血球感染後第一天輕微上升後第二天開始減少，持續至第 8 日後開始回升。

#### 肉眼病變：

實驗組豬隻剖檢其中全身淋巴結水腫，腸間淋巴結出現最早。

#### 病理變化：

非化膿性腦炎、大腦脊髓等中樞神經血管出現淋巴球圍管現象，間質性肺炎。

#### 抗體檢測：

抗體陽性接種前豬隻 PTV 幾何抗體力價平均為  $2^{7.14}$  於接種後第 6 日抗體陽轉( $2^{10}$ )，並持續維持至第 28 日。

抗體陰性組於接種後第 4 日抗體陽轉( $2^6$  倍)，第 6 日抗體陽轉( $2^{10}$ )，並持續維持至第 50 日。

#### 病毒分離：

#### 抗體陽性組

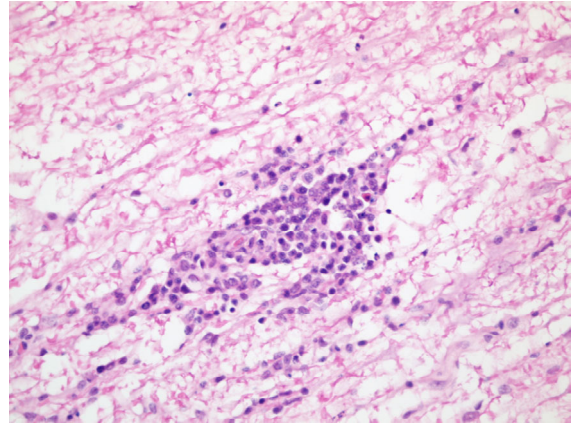
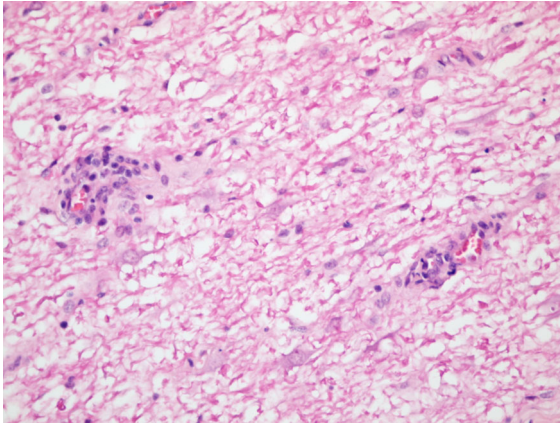
每日收集株之糞便拭子進行病毒排毒檢測，豬隻接種後第 2 天可從 3 頭豬隻之糞便中檢測出 PTV 病毒，並持續檢測出病毒，以第 5 日至第 9 日所檢測的豬隻都有 PTV 排毒最高，直到接種後第 28 日上可持續檢測出 PTV。

第 28 日：剖檢實驗組豬隻共 6 頭，可於豬隻肺臟、下顎淋巴結、扁桃腺、腸道、腸道淋巴節以及鼠蹊淋巴結能夠分離出 PTV。

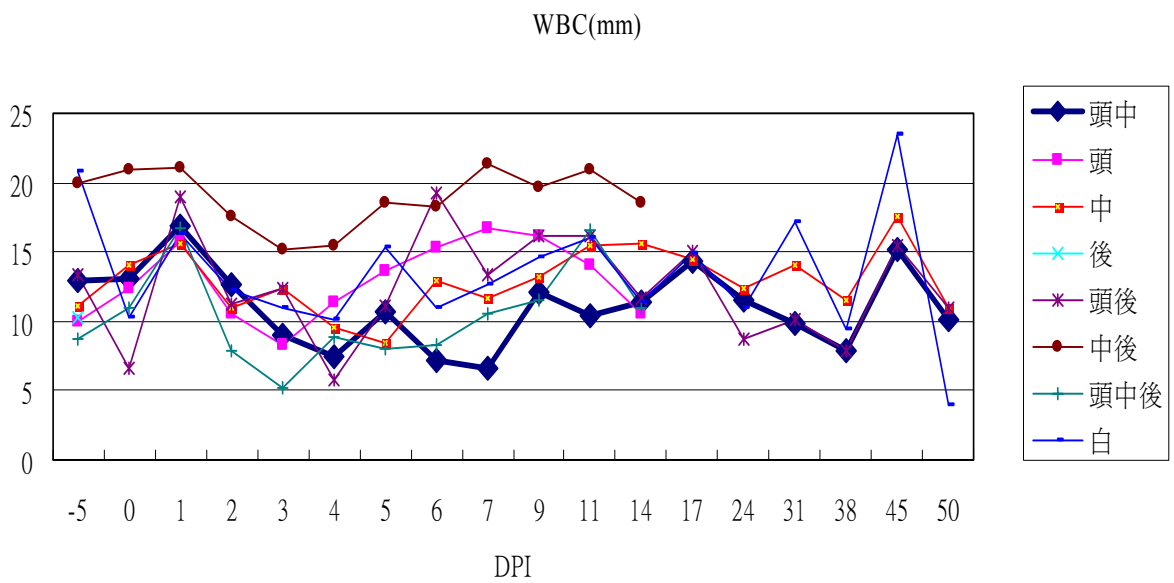
#### 抗體陰性組

每日收集株之糞便拭子進行病毒排毒檢測，豬隻接種後第 2 天可從 1 頭豬隻之糞便中檢測出 PTV 病毒，感染後第 2 天 6 頭豬隻都分離出 PTV，之後並持續檢測出病毒，其中以第 2 日至第 10 日所檢測的豬隻都有 PTV 排毒最高，直到接種後第 31 日可檢測出 PTV(表一)。鼻腔拭子：感染後第 3 日可從鼻腔分離出 PTV，並持續到第 15 日。其中感染後第 3 日至第 8 日每隻豬隻都可分離出 PTV(表二)。

豬鐵士古病毒(Porcine Teschovirus; PTV)為 Picornaviridae 科 Teschovirus 屬之單股 RNA 病毒，目前分為 11 個血清型，各血清型間無或具少量之交叉保護性，目前台灣分離株經由核苷酸序列比對屬於 PTV-1 血清型，根據本所豬瘟組由全台送檢之生病豬隻病例檢測，其病毒性疾病調查發現，PTV 的感染率已逐漸攀升，94 年佔病毒性豬病的第一位，95 年度感染率與 PCV2 不相上下，將台灣分離株進行豬隻接種實驗，以了解本病毒之毒力及其產生中抗體之表現。本實驗選擇 2 組豬隻進行實驗，實驗豬隻經由口鼻接種，觀察臨床症狀，發現本病毒株帶有毒力，豬隻出現發燒、精神沉鬱及下痢的臨床症狀。抗體檢測第 4 日豬隻出現抗體陽轉現象，顯示經口鼻接種方式成功，而本病毒能引發良好的中和抗體，抗體力價超過並維持 1024 倍，顯示本病毒具良好之免疫原性。在病毒檢測部分，於接種後第 28 日，肺臟、下顎淋巴結、扁桃腺、腸道、腸道淋巴節以及鼠蹊淋巴結能夠分離出 PTV，顯示本病毒亦可感染抗體陽性隻豬隻。而抗體陰性豬隻感染後發現豬隻可排毒達 31 日，感染豬隻病理學檢測出現非化膿性腦炎。惟經由臨床症狀觀察，PTV 病毒具有毒力，可造成豬隻出現臨床症狀，若需製造活毒疫苗則須經馴化以減除毒力，或利用病毒基因結構性蛋白 VP1 研發製造次單位疫苗。



圖一、病理病變（胸髓淋巴球圍管現象）



**Total Leukocyte count ( Normal range:11-22mm )**

圖二、抗體陰性組白血球檢測圖

表一、糞便排毒檢測結果

PTV isolated results from rectal swabs ( I )																											
experimentals: 6 pigs																											
DBI	DPI	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
5																											
0/6	Pig	0/6	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	3/6	3/6	3/6	5/6	2/3	1/3	1/3	3/3	3/3	0/3	2/3	3/3	2/3	2/3

PTV isolated results from rectal swabs ( II )																									
DPI	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

表二、鼻腔病毒檢測結果

PID0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	21	28	35	42	50
	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6	4/6	6/6	6/6	2/6	4/6	3/6	2/6	2/6	3/6	4/6	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4