

## 1998 年至 2000 年台灣地區牛海綿狀腦病監測

李淑慧\*、張國慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 摘要

為達國際畜疫會(Office international des epizooties ; O.I.E)所規範之牛海綿狀腦病之非疫區認定條件,依據其檢驗標準自 1998 年 7 月 1 日起至 2000 年 12 月 31 日止,共監測 85 頭牛腦,共製備 850 片組織切片,檢體分別來自屠宰場或化製場、結核病撲殺場、神經症狀牛隻與其他原因送檢病例,採樣地區包括北、中、南區八縣市,結果皆無牛海綿狀腦病特異病變。另以瑞士引進之西方墨點免疫轉漬法診斷套組檢測其中 30 件牛腦,亦未發現異常之普里昂(Prion)蛋白質粒子。此結果可提供作為 OIE 評鑑我國為非疫區之用。

**關鍵字：**牛海綿狀腦病，台灣地區，監測結果

### 緒言

狂牛病 (mad-cow disease), 又稱牛海綿狀腦病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE), 最早於英國牛隻發現。據研究顯示, BSE 與人類之變種庫賈氏症 (variant Creutzfeldt-Jakob Disease, vCJD)有關(14)。自從 1985 年英國爆發 BSE 後(16), 在世界上許多國家包括: 愛爾蘭、法國、瑞士、葡萄牙、荷蘭、比利時、盧森堡、列支敦斯登、西班牙、德國、義大利、捷克、希臘、日本、斯洛伐克等十七國也陸續有病例發生。台灣迄今未有病例報告為了人畜公共衛生及本省畜牧獸醫業之發展, BSE 之預警監控為一項重要的工作為減少人類暴露於 BSE 致病因子之危機中, 國際間已做成決議, 極力減少 BSE 在動物間傳播, 所有國家均需依據 OIE 之要求, 持續監測與強迫疫情通報, 若無監測資料, 則該國疫情視為不詳, 不能列為 BSE 之非疫區。緣此, 為瞭解我國畜養牛群有無有無 BSE, 保有我國養牛事業之永續發展, 建立本症之標準診斷模式及持續監控為當務之急。同時為 OIE 之非疫區認定條件, 故依據其檢驗標準(5), 自 1998 年 7 月 1 日起對台灣牛隻進行狂牛病之監測。

### 材料及方法

為達 OIE 之非疫區認定條件, 需提出連續七年監控無牛海綿狀腦病(BSE)病例之資料, 目前監測結果如下: 自八十七年七月一日至八十九年十二月三十一日止本所共蒐集 94 件經福馬林固定之牛腦檢體, 其中符合本監測計畫之抽樣標準者共計 85 件(1 件為年齡 20 月齡以下; 8 件為同一場次重複採樣之結核病撲殺牛, 此 9 件檢體仍予以檢驗, 但未列入本計畫之統計)。此 85 件檢體之來源資料詳述如表一至二。

**OIE 監測 BSE 之規範：**依據 OIE 2001 年 7 月 8 日, 對 BSE 非疫區國家監測之規範, 本土自產牛隻, 少於 50 萬頭牛隻須抽檢 24 月齡以上牛隻 50 頭, 我國 2000 年農業統計年報牛隻在養頭數為 161,700 頭, 至今已檢測 85 頭牛, 已符合 OIE 監測 BSE 之規範。

#### 檢體採樣來源：

30 件採樣自屠宰場或化製場之牛腦; 42 件採樣自結核病陽性撲殺場, 一場次一頭; 7 件為出現神經症狀牛隻之牛腦; 6 件為大於二歲齡牛隻因其他原因送至本所檢驗之牛腦。所有採樣來源已知之在養總頭數為 8,080 頭, 其中結核病撲殺場在養總頭數為 6,086 頭, 屠宰場或化製場之已知屠宰或化

\* 抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

製頭數為 1,564 頭，神經症狀牛隻之已知在養總頭數 378 隻，其他原因送檢牛隻之在養總頭數為 52 隻。1999 年度農業年報統計本省牛隻在養總頭數為 165,399 頭。

**檢體採樣之地區：**

北部地區之台北縣、新竹縣與苗栗縣分別採檢 13、1 件與 1 件；中部地區之台中縣與彰化縣分別採檢 10 與 27 件；南部地區之台南縣、高雄縣與屏東縣分別採檢 4、8 與 21 件。

**各年月之檢驗件數：**

- (1) 民國 1998 年 7 月 1 件，12 月 9 件。
- (2) 民國 1999 年 1 月 9 件，2 月 4 件，3 月 5 件，4 月 5 件，5 月 2 件，6 月 4 件，8 月 4 件，9 月 2 件，10 月 5 件，11 月 3 件，12 月 9 件。
- (3) 民國 2000 年 3 月 8 件，4 月 5 件，5 月 2 件，6 月 2 件，7 月 2 件，10 月 1 件，12 月 3 件。

**檢驗牛隻之平均年齡為 4.2 歲。**

**檢體採樣來源：**經過福馬林固定完全之送檢牛腦，送檢牛腦，依照圖 1 BSE 腦組織採樣圖示採 A-A、B-B、C-C 外，另外採樣檢查大腦與小腦總共十個部位，依一般例行之病理切片方法，將採取之組織經脫水、滲透、石蠟包埋，製作成 3-5µm 厚之切片，再以 H & E 染色後鏡檢。鏡檢上述 94 個牛腦，共 940 片腦組織切片。

**採樣對象**

- 1. 以組織病理學之評估檢查方法來進行 BSE 的定期採樣監測，採樣牛腦之對象包括：針對全省各屠宰場內之 20 月齡以上牛隻，每個月逢機採樣一頭。
- 2. 結核病陽性且 20 月齡以上牛隻送至行政院農業委員會家畜衛生試驗所進行撲殺者，每場次採樣一頭。
- 3. 臨床上有神經症狀之牛隻。

**1998 年七月一日至八十九年十二月三十一日**

**牛海綿狀腦病監測檢體採樣地區**

區別	縣市	件數
北區	台北縣	13
	苗栗縣	1
	新竹縣	1
中區	台中縣	10
	彰化縣	27
南區	台南縣	4
	高雄縣	8
	屏東縣	21
合計		85

**腦組織採樣：**

依據英國檢驗 BSE 的經驗顯示，病變出現率最高的部位是在腦與脊髓相連的延腦(如圖 A)，但若是病變較輕微或較不典型而懷疑的病例，則必須再檢查腦幹(如圖 B,C)才可確診，所以在採樣時應至少包括上述 A、B、C 三個部位進行組織病理學檢查。(詳見附圖 1)

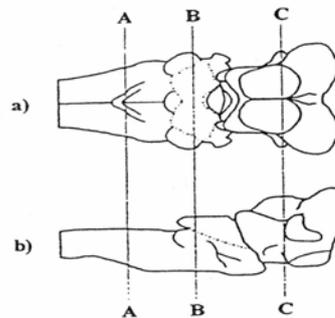


圖 1. 腦組織採樣圖示：

- a) 腦組織背面解剖圖
- b) 腦組織側面解剖圖

A-A：為位於第四腦室頂尾角之延腦 (medulla)組織之橫斷面

B-B：為延腦與小腦腳組織之橫斷面

C-C：為中腦與四疊體組織之橫斷面

**組織病理切片製作：**

將前述依檢體採樣來源所挑選感染牛隻所採樣之腦組織儘速固定於 10 % 中性福馬林固定液中至少兩週後，取出依照圖 1 腦組織採樣圖示進行修片，將固定好的腦組織

，以鋒利小刀將組織修整為厚度約 2-4mm 之組織塊，修整後組織需浸泡在 98%的蟻酸中 1 小時，再依一般例行之病理切片方法，將組織塊充份水洗後，經脫水、浸潤、石蠟包埋等步驟，製作成 3-5 $\mu$ m 厚之切片，以 H&E 染色後檢查。

### 西方墨點免疫轉漬法 (Western blotting) :

本所於今年(89 年)於瑞士引進 Prioncs 公司出品之 Prionics-Check Kit 狂牛病診斷套組 - 西方墨點免疫轉漬法 (Western blotting)，此診斷套組在歐美各國被廣泛使用於狂牛病之監測及診斷，尤其在英國使用最為普遍。本試驗自 1998 年至 2000 年止，共逢機採樣檢測其中 30 例牛腦組織。

使用瑞士 Prioncs 公司出品之 Prionics-Check Kit 診斷套組

#### 1. 待測樣品之前處理

- 1.1. 將新鮮(或是冷凍保存)之腦組織 0.5g 與 5ml Homogenization buffer 置入鐵胃中磨碎攪爛成泥狀，取 1-5ml 儲存備用。
- 1.2. 取 100 $\mu$ l (1)加入 10 $\mu$ l digestion buffer 加入 10 $\mu$ l proteinase K (20U/ml)置入 0.5ml PCR eppendorf 混合均勻 (50 $^{\circ}$ C, 40min)，然後加入 100 $\mu$ l PAGE sample buffer 以 pipetting 的方式混合均勻，(另外取 15 $\mu$ l control sample 至於 0.5ml PCR eppendorf 中)加熱至 95 $^{\circ}$ C，5min；此處理完之 sample 可直接進行 Western blot)

#### 2. Western blot

- 2.1. 將 1 處理好之 sample 先加熱至 65 $^{\circ}$ C，2 分鐘，順序加入 500 $\mu$ l antioxidant 至電泳槽之 inner chamber。(control sample 加入第一行中)跑電泳 200V，30-45min (染料跑至距 gel 底部 1cm 處)
- 2.2. 將跑完之 gel 切下 transfer 至 PVDF membrane，300mA, 40min
- 2.3. 取下 membrane 置於小盒中，加入 10ml 1 倍 Ponceau S (0.5% W/V Ponceau S, 5% acetic acid 原液為 20 倍，使用時稀釋為

1 倍)，震盪 30sec 至 2min，直到 marker 出現為止。

- 2.4. TBST 脫色 (Tris-Buffered-Saline with Tween)，亦即 TBS 加入 0.05% Tween-20，直到紅色消失為止。
- 2.5. 倒去 destaining buffer 後加入 PVDF blocking buffer 15ml (於室溫靜置 45min)
- 2.6. 取 12.5ml PVDF blocking buffer 加入一次 Ab 2.5 $\mu$ l (於室溫或是 4 $^{\circ}$ C overnight，再以 TBST 洗三次)。
- 2.7. 12.5ml TBST 加入二次 Ab 2.5 $\mu$ l (於室溫 45min，再以 TBST 洗三次) 浸泡於 15ml Luminescence buffer (震盪 5min)。
- 2.8. 5ml Luminescence buffer 加入 50 $\mu$ l CDP-Star (100 倍)。
- 2.9. 取出 membrane 放入卡匣中，於暗房中壓片 10min 觀察之。

### 結果

結果 5 例有神經症狀之牛隻經診斷為中山病感染症、弓蟲症及仔狀絲狀蟲感染等之病例，其牛隻之腦組織可見非化膿性腦膜炎與非化膿性腦脊髓膜炎之病變外，然所有組織切片並未見到神經元有海綿樣變性 (spongiform change) 之病理變化。

以西方墨點免疫轉漬法 (Western blotting) 進行牛腦組織監測，結果皆未發現異常之普里昂(Prion)蛋白質粒子，亦即牛海綿狀腦病 (狂牛病) 檢測皆為陰性。

監測結果我國至今未曾有牛海綿狀腦病之病例發生。

### 討論

BSE 是引起牛致死性腦部疾病，臨床症狀主要是行為異常包括有行動遲緩、動作無法協調、精神沉鬱、狂躁不安、流涎、舔鼻、磨

牙等，對聲音、光線或觸覺之刺激敏感(3)。BSE 是在英國 1985 年 4 月首次觀察到臨床症狀，於 1986 年診斷發表(16)，其病原是一種非傳統的傳染性病原，稱為變性 Prion，亦稱 PrP<sup>Sc</sup>，Sc 代表羊搔癢症 (Scrapie) 意思。該病原主要造成動物致死性神經變性的疾病。在人引起 CJD、在牛引起 BSE、在羊引起綿羊搔癢症等，在受感染宿主會形成腦組織的海綿狀變性、神經膠細胞增生等病變(9)。人、牛與羊之疾病之致病機序各有所不同，於 BSE 病例，可能是食用含有 Prion 病原之飼料所引起，潛伏期平均為五年。Prion 蛋白質稱為 PrP<sup>C</sup> 是正常細胞之蛋白質存在於神經細胞膜上，C 代表 Cellular 意思，PrP<sup>C</sup> 分子特性為全長約 254 個氨基酸，可完全被蛋白酵素所分解；但若 PrP<sup>C</sup> 於後轉譯過程中經修飾處理形成 209 個氨基酸的 PrP<sup>C</sup> 或結構轉變形成異常之 PrP<sup>Sc</sup>，PrP<sup>C</sup> 具有四個  $\alpha$  螺旋構造，若其中兩個  $\alpha$  螺旋構造轉變為  $\beta$  摺板構造就形成 PrP<sup>Sc</sup>，此結構改變之 PrP<sup>Sc</sup> 無法完全被蛋白酵素水解，其與蛋白酵素作用後會失去約 67 個氨基酸，形成約 142 a.a. 分子量約為 27-30 kD 的 prion rod，此 PrP<sup>Sc</sup> 對細胞及組織有病原性，其會插入腦神經細胞膜內且堆疊造成腦神經組織之空泡病變(1,2,4,6,7,11,12,15)。目前在病原的鑑定上尚未有確定的診斷方法，僅可由嚴重感染的牛隻腦部組織做成乳劑後，人工接種鼠來證實 BSE 的病原是可傳播感染的；但這種接種感染的方式卻最少須 292 天的感染期才能證實有無感染成立(5,12,15)。除此之外目前尚未有其他方法可證實是否有 BSE 的病原。以血清學檢測也無法在牛或羊隻樣品中證實出有傳染性海綿狀腦病感染的任何免疫反應。所以目前尚未有實際的檢驗方法能對顯現臨床症狀或已感染但仍處潛伏期的活體進行診斷。因此對 BSE 的診斷，在臨床上若能將其他疾病排除，再由懷疑病例之臨床症狀，配合組織學的檢查是最直接的診斷。現今 WHO (World Health Organization) 及 OIE 所承認的診斷方法以屍體剖檢檢查為主；依臨床疫情、症狀、顯微病理變化、免疫組織化

學染色技術及西方免疫墨點轉漬法等來作為 Prion disease 的診斷依據(5,8,12,13,15)。目前已有許多 anti-Prion 單株抗體供區別診斷 PrP<sup>C</sup> 與 PrP<sup>Sc</sup>。(8,9,10)

亦有許多學者致力於活體診斷法之開發，期能早期摘出病畜或病患，以阻止疾病之蔓延，但目前皆未被 OIE 或 WHO 所接受，這些活體診斷技術仍在評估當中。

近半年來狂牛病在歐洲捲土重來已掀起全歐恐慌。本來在英國的疫情已獲得控制，但最近在法國、德國、香港卻相繼傳出人感染 vCJD，西班牙、比利時、西班牙、德國、義大利、捷克、希臘等國卻爆發數十件動物的病例(9)，大家才驚覺狂牛病已悄悄地入侵歐洲。法國的「世界報」稱此事件為「歐洲危機」。以往研究只認為狂牛病只會在牛、羊品系中傳播，然近年來隨著證實人類食入感染狂牛病之牛肉也會感染 vCJD。陸續證實其他動物也會感染狂牛病，包括鹿、麋鹿、貂、貓、獅、豹等。據研究顯示狂牛病之所以會在歐洲死灰復燃，關鍵因素可能在於飼料，故歐盟已通過法令，自九十年一月一日起全面禁止使用含有動物製品的飼料供牛、豬及家禽食用，為期六個月，以避免畜齡 30 月以上的動物感染 BSE 進入食物鏈，造成危害。行政院農業委員會早有警覺性，早於八十六年就禁止國內反芻動物肉骨粉回飼反芻動物，並禁止有狂牛病發生國家之畜產品輸入，但台灣走私猖獗也增加本病發生之風險，本試驗依 OIE 規定進行國內 BSE 之監測(5)，以組織病理學及西方墨點轉漬法來偵測之，結果皆無發現牛海綿狀腦病之疑似病例。至今我國仍為 BSE 之非疫區。

## 參考文獻

1. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and

- cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 46: 417-428, 1986.
2. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB. Evidence for synthesis of Scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267(23): 16188-16199, 1992.
  3. Braun U, Amrein E, Estermann U, Pusterla N, Schonmann M, Schweizer T, Ehrensperger F, Vandeveld M, Kihm U. Reliability of a diagnosis of BSE made on the basis of clinical signs. *Vet. Rec.* 145: 198-200, 1999.
  4. Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-31) : The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13452-13457, 1997.
  5. Bovine Spongiform Encephalopathy . OIE Manual. Chapter 3. 2.13: 338-341, 1996.
  6. Griffith J.S. Self-replication and scrapie. *Nature*. 215: 1034-1044, 1967.
  7. Glatzel M, Aguzzi A. PrP<sup>C</sup> expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J. Gen. Virol.* 81: 2813-2821, 2000.
  8. Hardt M, Baron T, Groschup MH. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Comp. Path.* 122 : 43-53, 2000.
  9. Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1250(2): 187-93, 1998
  10. Madec JY, Belli P, Calavas D, Baron T. Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet. Rec.* 146: 74-76, 2000.
  11. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, and Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 40: 735-746, 1985.
  12. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 216: 136-144, 1982.
  13. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*. 35: 349-358, 1983.
  14. Prusiner SB. Prion disease and the BSE crisis. *Science*. 278: 245-251, 1997.
  15. Prusiner SB. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(23): 13363-13383, 1998.
  16. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419-420, 1987.
  17. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128(9): 199-203, 1991.

## Surveillance on Bovine Spongiform Encephalopathy in Taiwan in 1998-2000

Lee, Shu-Hwae, Kou-Hei Chang, Min-Chao Weng, Jei-Fu Su and Shih-Yuh Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

### SUMMARY

In order to fulfill the Office International des Epizooties (OIE) requirements for the statement of free area of bovine spongiform encephalopathy (BSE), 85 cattle brains were collected from the abattoirs, rendering plants and the cattle herds infected by *M. tuberculosis* located in 8 prefectures of Taiwan. Cattle developed CNS signs or showed other symptoms were also included. A total of 850 brain histologic tissue sections (10 sections/brain) were examined. None of the 850 brain tissue sections showed evidence related to spongiform change. Then, thirty out of the 85 brain tissue specimens were examined further by the Western blot diagnostic kit. No evidence of prion was found. These results could therefore provide for OIE to recognize Taiwan as a free country of BSE.

**Keywords:** *Bovine spongiform encephalopathy, M. tuberculosis, brain tissue sections*