

2002 年台灣牛海綿狀腦病及狂犬病之監測

李淑慧* 張國慧 蔡國榮 丁履紉 蕭終融 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 應用免疫組織化學染色技術，成功建立牛海綿狀腦病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 及狂犬病 (rabies) 免疫病理學診斷技術，並撰寫牛海綿狀腦病及狂犬病兩種疾病標準操作手冊(Standard Operation Procedure; S.O.P)。2002 年共監測 647 例 30 月齡以上牛腦，其平均年齡為 4.2 歲，製備 1,385 件牛腦組織切片，檢體分別來自屠宰場、結核撲殺場與送檢病例之牛隻，採樣地區包括桃園、台中、彰化、雲林、南投、台南、屏東、宜蘭、台東、澎湖及金門等十一縣，結果皆無牛海綿狀腦病特異病變。另以酵素連結免疫吸附法及西方免疫墨點法檢測 647 例牛腦，及回溯以往四年 90 例牛腦組織，亦未發現異常之普里昂 (prion) 蛋白質。此結果可提供作為世界動物衛生組織評鑑我國為非疫區之用。應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法及免疫組織化學染色技術檢測 56 例犬腦組織，結果皆未檢測出狂犬病抗原。另利用酵素連結免疫吸附法檢測 4,317 件犬隻血清中狂犬病抗體，其中家犬佔 1,946 件，陽性率為 41.0%，流浪犬佔 2,371 件，陽性率為 21.4%。至今台灣仍為牛海綿狀腦病及狂犬病之非疫區。

關鍵字：牛海綿狀腦病、狂犬病、監測、台灣

緒 言

近年來兩岸往來頻繁加上走私猖獗，許多人畜共通傳染病可能會隨著走私管道而引入，如馬來西亞發生之立百病、大陸之狂犬病、香港之禽流感、澳洲之亨德拉病、英國之牛海綿狀腦病及美國紐約之西尼羅病等，這些惡性人畜共通傳染病外觀上皆無特異病徵，無法由肉眼診斷，一定需仰賴病理學及病原分離方可確診，然病原分離常受限於設備及人員之素質與經驗，且有散播病原之虞，而免疫病理診斷技術則可彌補前者之缺點，安全迅速地於第一時間內應用免疫

病理學之技術於福馬林固定後之組織細胞中偵測出病原，達到確診疾病之目的，進而控制及消滅該病，故人畜共通傳染病免疫學診斷實驗室之建立，實為刻不容緩。目前本所已依世界動物衛生組織訂定之診斷標準，建立BSE及rabies之實驗室生物安全、組織病理學診斷、免疫組織化學染色法、酵素連結免疫吸附法及西方免疫墨點法等實驗室標準診斷流程並持續進行本病之監控計畫[1,2,3,14]。本報告將已建立之牛海綿狀腦病及狂犬病實驗室診斷方法詳加說明，並報告目前之監測結果。

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

材料及方法

除以組織病理學檢查外, BSE 需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法等其中一種檢驗方能進行確診, rabies 則需配合直接免疫螢光標示抗體檢查法、免疫組織化學染色法及病毒分離結果進行確診, 茲將已建立之實驗室診斷與監測方法詳述如後:

一、組織病理學診斷

BSE組織病理學診斷

將採集的牛腦組織置於 10 % 中性福馬林液固定完全後, 取大腦、小腦及腦幹共十個部位的腦組織。本病重點部位為延腦 (medulla oblongata) 成“V”字形尖端的門 (obex) [15,19], 將之修整成約 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), 然後轉置 10% 中性福馬林液中 2 天。最後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。

Rabies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) [11,17,18] (圖 3)。

1. 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 公分為原則)。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。
2. 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中 24 小時。取出切片水洗再置於 1.5% 氫氧化鈉酒精溶液 10 分鐘, 使切片染成粉紅色

判讀之。動物若有狂犬病感染, 可在神經元細胞質內觀察到狂犬病特異性之病毒包涵體 - 奈格利小體 (Negri bodies), 奈格利小體為朱紅色, 神經元細胞核為紫紅色, 核染色質為藍色、紅血球為粉紅色。

3. 直接免疫螢光標示抗體檢查法 (Direct immunofluorescent test)

本法是狂犬病最快速且準確的標準診斷方法, 各國狂犬病診斷實驗室對疑似狂犬病的動物檢體皆採用本檢查法, 其敏感性比接種小白鼠分離病毒高 [11,17,18]。本法是將感染動物的腦組織作成捺壓片後, 以 FITC (fluorescein) 螢光標示之狂犬病單株抗體來染色, 該標示抗體若與狂犬病抗原結合後會形成抗原抗體結合體, 在螢光顯微鏡下被紫外光源照射激發而發出綠色螢光 (圖 4); 若檢體沒有狂犬病抗原則不會被染色而不具螢光。

二、免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)

BSE 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牛腦組織中的異常的 PrP^{Sc} [7,8]。其組織切片製作方法與組織病理學診斷之步驟相同, 但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羊搔癢症病例切片)。組織切片先經兩次二甲苯溶液脫蠟, 再經 100%、95%、80%、60% 酒精, 最後用蒸餾水洗, 每步驟浸泡 3 分鐘。進行脫蠟後, 以磷酸鹽緩衝液 (0.1M phosphate buffer solution, pH7.2, PBS) 洗 3 次, 每次 5 分鐘, 然後置於蛋白 K 溶液 37°C 15 分鐘。將切片放入沸水中, 置於 1bar 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-雙氧水溶液中 5 分鐘以去除內源性過氧化, 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. 或 6H4, Prionics®), 置於 37°C 4 小時或 4°C 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, 然後在組織上滴滿受質 (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, 在組織上滴滿呈色劑 (AEC or DAB substrate, DAKO ChemMate Detection Kits), 於室溫 5 分鐘, 用蒸餾水洗。滴上蘇木精複染 20 秒, 然後水洗, 滴上封片膠, 蓋上蓋玻片, 置於顯微鏡下鏡檢。在顯微鏡下觀察經免疫染色之組織切片, 以 DAB 染色陽性者會出現大量褐色顆粒沉積或聚集的異常 prion 蛋白質; 以 AEC 染色陽性者則可見大量紅色顆粒沉積或聚集。

Rabies 免疫組織化學染色法

利用對狂犬病病毒糖蛋白 (glycoprotein) 特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測腦組織中的狂犬病抗原[11,17,18]。其組織切片製作方法與組織病理學診斷之步驟相同, 但每次染色需同時染陽性對照。組織切片經脫蠟後, 以磷酸鹽緩衝液 (PBS) 洗 3 次, 置於 1bar 121°C 高溫高壓滅菌器中 20 分鐘後, 再以上述 PBS 洗 3 次後置於甲醇-雙氧水溶液中 5 分鐘以去除內源性過氧化酶, 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 μ L), 於室溫 20 分鐘, 倒掉血清。在組織上滴滿狂犬病病毒單株抗體 (1:500, Rabies virus Ab-1, Clone Rab-50, mouse monoclonal antibody, NeoMarkers®), 置於 37°C 4 小時或 4°C 隔夜, 再滴滿次級抗體 (biotinylated secondary antibody, DAKO ChemMate Detection Kits), 室溫 10 分鐘, 以 PBS 沖洗, 組織上滴滿受質 (peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate Detection Kits), 置於室溫 10 分鐘。組織上滴滿呈色劑 (AEC or DAB substrate, DAKO ChemMate Detection Kits), 用蒸餾水洗。最後以蘇木精複染, 封片後置於顯微鏡下鏡檢。DAB 染色試劑陽性者於神經元細胞質內會出現褐色顆粒沉積或聚集的抗原; AEC 染色試劑陽性者則可見紅色顆粒沉積或聚集。

三、酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

BSE 酵素連結免疫吸附分析法偵測病原

採用商品化檢測套組 (BSE purification kit & PLATELIA® BSE detection kit, Bio-Rad), 為目前最快速且敏感的檢測方法。選取延腦的門 (obex) 或腦幹或大腦灰質部的腦組織, 秤重後加入 320 mM 蔗糖溶液研磨成 10 倍均質乳劑。取 500 μ L 腦乳劑加 500 μ L 蛋白 K 溶液混合均勻, 置於 37°C 10 分鐘。再加 500 μ L clarifying solution, 混合均勻後離心 20,000g 5 分鐘, 倒掉離心管中的液體, 並倒立於吸水紙上 5 分鐘。再各加 50 μ L resolving buffer, 置於 100°C 加熱 5 分鐘, 混合均勻後加入 250 μ L sample diluent。取出檢測盤, 於孔內分別加入 100 μ L 陽性對照、陰性對照及待測樣品, 用膠片封盤, 置於 37°C 感作 75 分鐘。以 washing solution 清洗三次, 拍乾後加 100 μ L conjugate, 再用膠片封盤, 置於 4°C 感作 60 分鐘, 以 washing solution 清洗五次, 拍乾後加 100 μ L revelation solution, 置於室溫下之暗室 30 分鐘, 再加 100 μ L stopping solution, 以 450/620 nm 波長 ELISA reader 讀取結果。

Rabies 酵素連結免疫吸附法檢測抗體

將待測血清或血漿以 56°C 30 分鐘非働化。將 96 孔抗原盤從 4 °C 冰箱中取出, 置於室溫中回溫。取一新的 96 孔盤稀釋盤, 加入 150 μ L ELISA 緩衝液至 B1、B2、C1、C2、D1、D2 微量孔中, 其餘各微量孔則加入 203 μ L ELISA 緩衝液。將各二重複 7 μ L 的待測血清由 F1、G1 起依序加至 G12、H12 已有緩衝液之微量孔中, 一盤可做 43 個檢體。陽性對照二重複進行 30 倍序列稀釋: 由 A1、A2 孔各取 75 μ L 至 B1、B2 孔, 混合均勻後取 75 μ L 至 C1、C2 孔, 混合均勻後取 75 μ L 至 D1、D2 孔。打開 96 孔抗原盤包裝, 甩掉盤內油性之保存液, 倒置於毛巾或吸水紙上拍乾, 以盡量將液體除去。每孔加入 250 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, 如此重覆清洗四次。將 96 孔稀釋盤內的稀釋檢體與陽性、陰性對照各取 100 μ L 至相對位置之 96 孔抗原盤內。將 96 孔抗原盤以封盤膜密封, 置於 37°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤, 甩掉盤內液體, 每孔加入 250 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, 如此重覆清洗四次。每孔加入 100 μ L 結合物溶液 (conjugate), 然後以封盤膜密封, 置於 37°C 感作 1 小時。取出 96 孔抗原盤,

甩掉盤內液體，每孔加入 250 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，如此重覆清洗四次。取等量之 A 液與 B 液混合均勻，配製成受質溶液（使用前再配）。每孔加入 100 μ L 受質溶液 (substrate)，置於室溫 15 分鐘。每孔加入 50 μ L 停止液混合均勻，以終止反應。10 分鐘內以 ELISA reader 讀取波長 450 nm 之吸光值及以 620 nm 為參考波長來判讀結果。當檢測樣本吸光值 (OD value) 大於陰性對照吸光值加 0.1 時則判定為抗體陽性；反之小於陰性對照吸光值加 0.1 者判為抗體陰性。

四、西方免疫墨點法 (Western immunoblotting)

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 K 有抵抗性的 PrP^{Sc}，因為正常的 prion 蛋白質會被蛋白 K 所消化，而不正常的 PrP^{Sc} 對蛋白 K 具有抗性，只會被部分消化，所以分子量會由 32-35 kDa 變為 27-30 kDa [4,5,13,16]。選取延腦的門 (obex) 或腦幹或大腦灰質部的腦組織，秤重後加入 320 mM 蔗糖溶液研磨成 10 倍均質乳劑，取 100 μ L 乳劑加 10 μ L 消化緩衝液及 10 μ L 蛋白 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 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) 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。

五、回溯研究 (Retrospective research)

BSE

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 日開始進行本病之持續性監測工作，採樣對象為 30 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。福馬林固定之牛腦以上述之組織病理學診斷方法進行檢驗；冷凍牛腦以上述之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。

Rabies

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狂犬病抗體，以了解台灣犬隻抵抗狂犬病病毒入侵之能力。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檢測狂犬病抗原。若臨床上遇有神經症狀或是疑似狂犬病或犬瘟熱病例犬隻，應用組織病理學、直接免疫螢光標示抗體檢查法、免疫組織化學染色法等技術，檢測其腦組織中狂犬病抗原之有無。

結果與討論

一、BSE 組織病理學診斷

經 H&E 染色之組織切片於顯微鏡下進行判讀，感染 BSE 牛隻在神經病理學上主要呈三個特殊病變為：1. 腦皮質灰質部產生空洞狀退化。2. 神經元細胞壞死及數目減少。3. 神經星狀膠質細胞增多 (astrocytosis)，使腦組織呈現海綿樣變性 (spongiform change)。本年度監測 647 例牛腦製備 1,385 件切片，經 H&E 染色之組織切片於顯微鏡下觀察，皆沒有發現典型 BSE 病變。

二、Rabies 組織病理學診斷

將 56 例犬腦組織製備成 336 件腦組織切片，經 H & E 染色後於顯微鏡下觀察，並未發現 rabies 特徵性病變。

三、BSE 免疫組織化學染色法

應用向美國肯德基大學洪春彬教授分讓之羊搔癢症 (scrapie) 組織切片作為陽性對照，在顯微鏡下觀察經免疫染色之組織切片，以 AEC 染色可見大量紅色顆粒沉積或聚集的異常 prion 蛋白質 (圖 1、2)。本研究已成功建立 BSE 免疫組織化學染色技術。

四、Rabies 免疫組織化學染色法

應用對狂犬病病毒糖蛋白 (glycoprotein) 特異性的單株抗體及免疫染色技術來偵測腦組織中的狂犬病抗原。分讓自衛生署疾病管制局感染 rabies 病患唾液接種小白鼠腦組織切片作為陽性對照，在顯微鏡下觀察經免疫染色之組織切片，以 AEC 染色於運動神經元細胞質內可見紅色顆粒沉積或聚集。本研究已成功建立 rabies 免疫組織化學染色技術。

五、BSE 監測結果

自 2002 年 1 月 1 日至 2002 年 12 月 31 日止，共監測 647 例牛腦，檢體採樣來源及數量如表一所示，檢體來源自 30 月齡以上出現之神經症狀病死牛隻 3 件、屠宰場或化製場逢機採樣 621 件、結核病陽性撲殺牧場 16 件及其他原因送檢至本所檢驗之病例 6 件，檢驗牛隻平均年齡為 4.2 歲，來源縣市包括北、中、南區及離島共 11 縣市(表二、三)，分別為桃園縣 565 件、台中縣 1 件、彰化縣 10 件、雲林縣 4 件、南投縣 7 件、台南縣 11 件、屏東縣 14 件、宜蘭縣 2 件、台東縣 5 件、澎湖縣 12 件及金門縣 16 件，檢驗結果皆為陰性。另以酵素連結免疫吸附法及西方免疫墨點法檢測 647 例牛腦，及回顧以往四年 90 例牛腦組織，亦未發現異常之普里昂 (prion) 蛋白質粒子。至目前為止，台灣仍為 BSE 之非疫區。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[14]。日本於 2001 年 9 月發現亞洲地區首宗 BSE 病例，至今已檢出五例。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二十二個國家 (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。

六、Rabies 監測結果

共收集北、中、南、東及金門等地家犬及流浪犬之血清 4317 件，應用酵素連結免疫吸附法檢測血清中狂犬病抗體，結果陽性率平均為 30.2% (1,304/4,317)；其中家犬為 41% (797/1,946)，流浪犬 21.4% (507/2,371)。顯示台灣犬隻抵抗狂犬病病毒入侵之能力，明顯不足，一旦有野外 rabies 病毒入侵，恐怕台灣會有發生 rabies 流行的機率。採集北、中、南、東流浪犬收容中心流浪犬之腦組織 56 例，應用組織病理學、直接免疫標示抗體染色檢查法、免疫組織化學染色法等技術，共檢測 336 件犬腦組織切片，結果皆無偵測到狂犬病之抗原及特徵性病變。至目前為止，台灣仍為 rabies 之非疫區。但應加強全民對此疾病之認識，定期對自己所飼養之家犬注射 rabies 疫苗，嚴格控管流浪犬且減少其族群之擴張。

參考文獻

1. 李淑慧、張國慧、翁敏召、蘇杰夫、林士鈺。1998 年至 2000 年台灣地區牛海綿狀腦病監控。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告年報 36: 1-6.2000
2. 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: 1-8.2001
3. 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
4. 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(1): 64-70, 2001
5. Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandeveld M, Heim D. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 145: 672, 1999
 6. Dormont D. Prions, BSE and food. *Int J Food Microbiol* 78:181-189, 2002
 7. 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
 8. Haritani M, Spencer YI, Wells GAH. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol* 87: 86-90, 1994
 9. Jerome M, Lemaire C, Bautista JM, Fleurence J, Etienne M. Molecular phylogeny and species identification of sardines. *Agric Food Chem* 51:43-50, 2003
 10. Jones V, Martin TC, Keyes P, Dawson M. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 139: 360-363, 1996
 11. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. World Health Organization, Laboratory techniques in rabies. pp. 157-174, 1996
 12. Meyer R, Hofelein C, Luthy J, Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int* 78: 1542-51, 1995
 13. 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
 14. Office International des Epizooties (OIE). Surveillance and monitoring systems for bovine spongiform encephalopathy. In: International Animal Health Code. Part 3, Appendix 3.8.3, 2001
 15. 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
 16. 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
 17. Texas department of Health. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Centers for Disease Control, Rabies procedure Manual, 1996
 18. 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
 19. 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

表一 2002 年台灣地區牛海綿狀腦病監測檢體採樣來源

來 源	牛腦件數	牧場在養頭數
屠宰場	621	3,279
結核病陽性撲殺場	16	2,235
神經症狀牛隻	3	30
私宰查緝	1	0
送檢病例	6	78
合 計	647	5,622

表二 2002 年台灣地區牛海綿狀腦病監測檢體採樣之地區

區 別	縣 市	牛腦件數
北 區	桃園縣	565
	台中縣	1
中 區	彰化縣	10
	雲林縣	4
	南投縣	7
南 區	台南縣	11
	屏東縣	14
東 區	宜蘭縣	2
	台東縣	5
離 島	澎湖縣	12
	金門縣	16
合 計		647

表三 2002 年台灣地區牛海綿狀腦病監測各月份之檢驗件數

月 份	牛腦件數	切片數量
1	1	10
2	1	10
3	1	10
4	8	80
5	77	104
6	49	166
7	70	160
8	68	104
9	71	143
10	122	266
11	75	210
12	104	122
合 計	647	1,385

備註： 1. 檢驗牛隻之平均年齡為 4.2 歲
2. 統計自 2002 年 1 月 1 日至 12 月 31 日止

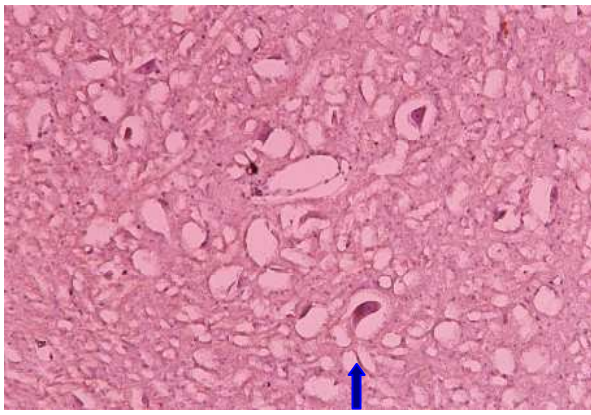


圖 1 山羊搔癢症腦組織切片 H & E 染色，可見神經細胞呈明顯海綿樣空洞化病變(如箭頭)。x400

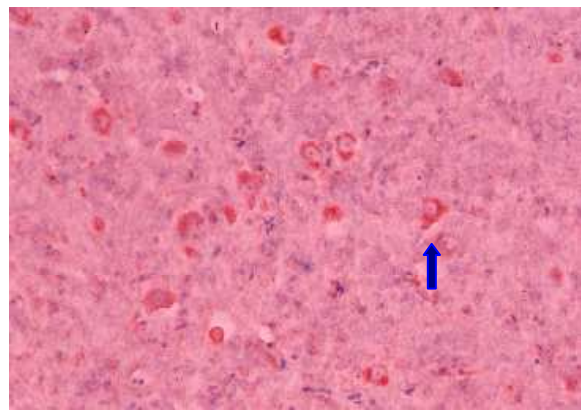


圖 2 山羊搔癢症腦組織切片，免疫組織化學染色以 AEC 呈色，於神經元細胞質內可見明顯紅色顆粒沉積及聚集(如箭頭)。x400

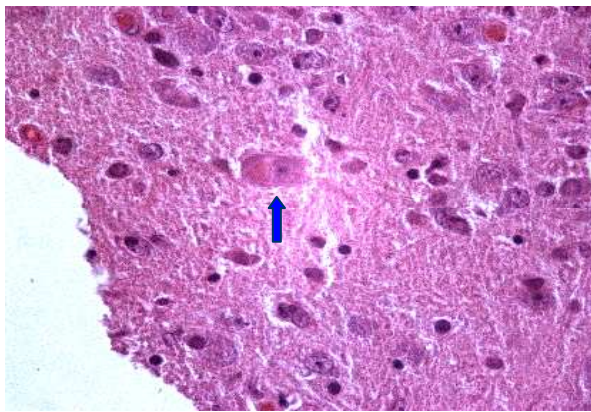


圖 3 rabies 病患唾液人工感染老鼠腦組織切片，於運動神經元內可隱約看到 rabies 特徵性 negri body(如箭頭)。H & E stain, X400

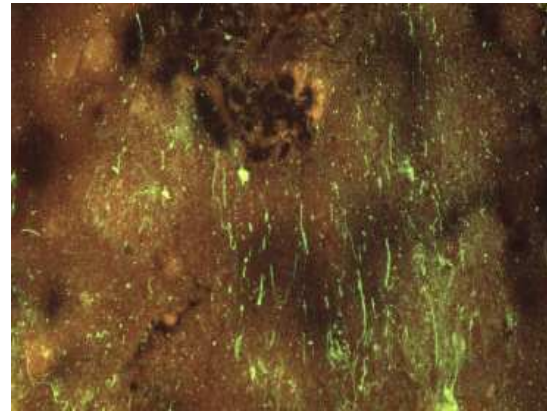


圖 4 rabies 陽性對照腦組織捺壓片，可見抗原於細胞質內呈流星雨狀及滿天星斗般明亮之綠色螢光。X100

Surveillance on the bovine spongiform encephalopathy and rabies in Taiwan in 2002

LEE Shu-Hwae*, Kou-Hei CHANG, Kwok-Rong TSAI, Lu-Jen TING, Jong-Rong SHIAU, Shih-Yuh LIN

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture

ABSTRACT We have established a fast and accurate screening technique based on immunopathology to detect bovine spongiform encephalopathy (BSE) from bovine and ovine brain tissues standard operation procedures for the screening of BSE and rabies were established, too. By following these procedures, the risk of BSE from imported food and the spread and damage of BSE and rabies would be greatly reduced. A total of 647 cattle brains aged older than 30 months (4.2-year-old in average) were screened in 2002. Totally, 1,385 brain sections collected from the abattoirs and *M. tuberculosis* contaminated farms scattered through 11 counties, including Taoyang, Taichung, Chunghwa, Yunling, Nantao, Tainan, Pingtung, Ilan, Taitung, Panfu, and Kingmen, were examined. None of those samples showed spongiform change in pathology. Besides, enzyme-linked immunosorbent assay and Western immunoblot assay were used to examine 647 cattle brains and 90 cattle brains collected since 1999 to 2002, also showing negative results in prion protein. These results would be submitted to the World Organisation for Animal Health to claim that Taiwan is a BSE free area. Fifty-six canine brains were also examined in histopathological sections and stained with direct immunofluorescent antibodies, showing negative results. An enzyme-linked immunosorbent assay was applied to detect the specific antibodies to rabies in 4,317 dog serum samples. Among those serum samples, 1,946 samples were from domestic dogs and 2,371 were from stray dogs. Result revealed that 41.0% of domestic dogs and 21.4% of stray dogs were positive in ELISA.

* Corresponding Author
Animal Health Research Institute