



淺談國內

水泡性疾病之區別診斷

林有良 組長 本所疫學研究組

引起動物產生水泡病變的病毒性病原，包括小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 口瘡病毒屬 (Aphthovirus) 的口蹄疫病毒 (FMDV) 及腸病毒屬 (Enterovirus) 的豬水疱病病毒 (SVDV)，桿狀病毒科 (Rhabdoviridae) 水疱病毒屬 (Vesiculovirus) 的水疱性口炎病毒 (VSV)，以及杯狀病毒科 (Caliciviridae) 杯狀病毒屬 (Calicivirus) 的豬水疱疹病毒 (VESV)。其中的口蹄疫病毒具有七種血清型，主要是感染豬牛羊等偶蹄類動物，具有高度傳染的特性，目前仍在許多國家流行，也是全世界所矚目的動物傳染病焦點，此病不僅被世界動物衛生組織 (OIE) 列為必須通報的表 A 疾病之一，也是 OIE 目前列為各國必須共同撲滅的動物傳染病。因此，只要偶蹄類動物臨床上出現水泡病變，就必須進行區別診斷，以釐清是否為口蹄疫病毒感染所造成，一旦確診是口蹄疫，就會採取撲殺與疫苗注射的緊急防禦策略，以防堵疫情的擴散；而豬水疱病則以感染豬隻為主，毒力上呈現不同樣貌，從無症狀、輕微症狀到極嚴重症狀，目前在國內的養豬場幾乎見不到極嚴重症狀案例，但是本病在臨床上，與其他水泡性疾病均無法區別；豬水疱疹病毒多來自魚及海洋哺乳類動物，在 1972 年曾於聖來加拉的海獅 (San Miguel Sea Lion) 分離到與豬水疱疹病毒很像的病毒。豬水疱疹病毒是經由餵食海洋生物而引起豬隻感染，其臨床症狀與口蹄疫、豬水疱病及水疱性口炎等水泡性疾病無法區別。2008 年加拿大報告多起豬隻特定性水泡性疾病 (Idiopathic vesicular disease)，引起該病的病原是小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 矽尼卡病毒屬 (Sinecavirus) 的矽

尼卡谷病毒 (SVV)，本病在臨床上也難與其他水泡性病原感染區別，是一種新興的特定性水泡性疾病。上述 5 種水泡性病原必須藉由實驗室的區別診斷，方能釐清是何種病毒感染所造成。

由於口蹄疫是偶蹄類動物的一種高度傳染性疾病，為我國必須通報的甲類動物傳染病之一，為避免病原從實驗室散溢出去，造成另一個新的疫情爆發點，因此對於疑似水泡性疾病的診斷，包括水泡液、水泡上皮、皮膚組織、咽喉液、血清等檢體的前處理及病毒分離鑑定都必須在 Agricultural Biosafety Level 3 (Ag-BSL-3) 級負壓實驗室內進行；而 RT-PCR 由於是檢測病毒核酸，所以在完成檢體前處理，加入核酸萃取液後，經過適當之消毒程序，即可自 Ag-BSL-3 級實驗室移至 BSL-2 級實驗室進行 RT-PCR 檢測。

上述五種不同的水泡性病原，其感受性動物分別為：口蹄疫病毒可感染牛、羊及豬等偶蹄類動物，但親豬源口蹄疫病毒株則只會感染豬隻；豬水疱病病毒只會感染豬隻；水疱性口炎病毒可感染馬、牛及豬；豬水疱疹病毒只會感染豬隻，太平洋附近之魚類及海洋哺乳類動物為帶毒動物；矽尼卡谷病毒目前只有感染豬隻的報告，是否會感染其他動物，則尚待釐清 (表 1)，因此在國內若是豬隻出現水泡性病原的感染病例，並無法以臨床表徵區別是何種水泡性病原所造成 (圖 1~ 圖 3)。

根據世界動物衛生組織 (OIE) 陸生動物診斷測試及疫苗手冊，以及文獻記載，實驗室以細胞培養進行水泡性病原分離：口蹄疫病毒可使用牛初代甲狀腺細胞、牛羊豬之初代腎臟細胞、幼倉鼠細胞株 (BHK-21)、豬腎臟細胞株 (IB-RS-2) 或 2-7 日齡哺乳小白鼠進行病毒分離；豬水疱病病毒可使用豬源細胞 [例如：豬腎臟細胞株 (PK-15)、豬睪丸細胞株 (Sty)]、IB-RS-2 細胞株或第 2 代小羊腎臟細胞進行病毒分離；水疱性口炎病毒可使用非洲綠猴腎臟細胞株 (VERO)、幼倉鼠細胞株 (BHK-21)、IB-RS-2 細胞株、2-7 日齡哺乳小白鼠、3 週齡小白鼠或 8-10 日齡雞胚蛋進行病毒分離；豬水疱疹病毒可使用豬腎臟細胞株 (MVPK) 或初代豬腎臟細胞進行病毒分離；矽尼卡谷病毒可使用豬睪丸細胞株 (ST)、豬腎臟細胞株 (SK-RST) 或人肺癌細胞株 (NCI-H1299) 進行病毒分離，因此使用不同的細胞進行病原分離，可略以窺知是何種水泡性病原所造成 (表 2)，惟各種細胞對各病毒株的敏感性不一，因此對於所分離之病毒，仍應藉由其他方法進行病原確認，而不宜以所藉以分離之細胞種類草率



判定是何種水泡性病原。

目前國內在分離水泡性病原所使用的細胞有 BHK-21、胚牛腎臟細胞株 (EBK)、Sty 及 Vero 等細胞株。由於目前國內曾出現的水泡性疾病包括豬水疱病、口蹄疫及矽尼卡谷病毒感染症等三種，因此針對水泡性檢體都先接種於 EBK、BHK-21 及 Sty 等單層細胞，如該三種細胞之任一種以上細胞出現 CPE，則需將出現 CPE 之培養液以購自英國 Pirbright 口蹄疫世界參考實驗室之口蹄疫及豬水疱病 ELISA- 抗原檢測套組進行檢測，並進行該三種水泡性病原之 RT-PCR 檢測。檢測結果若 ELISA- 抗原為陽性反應時，則據以判定為口蹄疫或豬水疱病陽性，此時 RT-PCR 之口蹄疫或豬水疱病陽性產物將進行核酸定序以作為區別病毒株基因型或確診佐證之用；若前述 ELISA- 抗原檢測結果為陰性反應，但 RT-PCR 結果為陽性反應時，則依據下面 RT-PCR 結果判定標準進行判定，並將 RT-PCR 之陽性產物進行核酸定序以作為確診之佐證以及區別病毒株基因型之用；若前述 ELISA- 抗原及 RT-PCR (FMDV、SVDV、SVV) 檢測結果均為陰性反應，則進行 VSV 與 VESV 之 RT-PCR 檢測，並輔以電子顯微鏡檢查，俾便進行其他病原鑑定，且將檢體另外接種於 Vero 單層細胞，若出現 CPE，且 BHK-21 單層細胞也出現 CPE，而 VSV 之 RT-PCR 結果為陽性，則判定為 VSV 陽性，此 RT-PCR 陽性產物經核酸定序後作為確診佐證以及區別病毒株基因型或血清型之用；若檢體接種於 EBK、BHK-21、Sty 及 Vero 等單層細胞，如任一種單層細胞於接種 72 小時均未出現 CPE，則將第一代接種細胞經冷凍解凍以及離心後，取上清液進行第二次繼代培養，若任一種單層細胞在接種後 72 小時內即出現 CPE，則依據上述標準判定；若任一種單層細胞在接種後 72 小時均未出現 CPE，則判定為病毒分離陰性。有關國內以細胞分離水泡性病原的判別基準，請參考表 3。

除了病毒分離外，在國內水泡性病原的區別診斷上，也同時應用反轉錄 - 聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 方法進行病原核酸檢測。水泡性檢體均先進行豬水疱病、口蹄疫及矽尼卡谷等病毒的 RT-PCR 檢測，若檢測結果均為陰性時，則立即進行水疱性口炎病毒 (VSV) 及豬水疱疹病毒 (VESV) 之 RT-PCR 檢測。當檢體分別以口蹄疫病毒 (FMDV)、豬水疱病病毒 (SVDV) 及矽尼卡谷病毒 (SVV) 特異性引子進行 RT-PCR 反應時，若 SVDV 及 SVV 均為陰性，而 FMD 之 2 對引子〔一對為 OIE 推薦之通性 (universal) 引子，另一對為針對

口蹄疫 VP1 設計之 O 血清型特異性引子) 均為陽性，則判定是 FMD 陽性；若 FMD 之 2 對引子中只有 1 對引子為陽性，則將該 RT-PCR 陽性產物進行核酸定序，並由豬瘟研究組另 1 個實驗室以該 2 對 FMDV 引子進行再確認，再確認試驗結果只要有 1 對引子以上出現陽性，則判定是 FMD 陽性；若再確認試驗該 2 對引子之 RT-PCR 結果均為陰性，則須俟該對 RT-PCR 陽性產物完成核酸定序後再判定之；若 RT-PCR 反應結果 FMDV 為陰性，而 SVDV 或 SVV 其中之一出現陽性，則據以初判為該陽性病原，並以後續核酸定序結果，做為最後確診的依據。當 RT-PCR 反應結果 FMDV、SVDV 及 SVV 均為陰性，而 VSV 及 VESV 之 RT-PCR 檢測結果其中之一出現陽性，則據以初判為該陽性病原，並將其 RT-PCR 陽性產物進行核酸定序，以做為最後確診以及區別病毒株基因型或血清型的依據。有關國內以 RT-PCR 方法檢測水泡性病原的判別基準，請參考表 4。

表 1、五種不同水泡性病原之感受性動物。

病毒種類	牛	羊	豬	馬	其他
口蹄疫病毒	v	v	v		鹿、駱駝等其他偶蹄類動物
豬水疱病病毒			v		
水疱性口炎病毒	v	v	v	v	
豬水疱疹病毒			v		魚類及海洋哺乳類動物為帶毒動物
矽尼卡谷病毒			v		其他動物之感受性尚待釐清

註：1. v 表可感染該動物別；

2. 親豬源口蹄疫病毒株 (Cathay strain) 則只會感染豬隻。

表 2、依據世界動物衛生組織 (OIE) 陸生動物診斷測試及疫苗手冊或文獻記載，以細胞種類區別五種不同水泡性病原。

病毒種類	BHK-21	PK	ST	Vero	NCI-H1299
口蹄疫病毒	v	v			
豬水疱病病毒		v	v		
水疱性口炎病毒	v	v		v	
豬水疱疹病毒		v			
矽尼卡谷病毒		v	v		v

註：1. v 表該病毒可在該細胞增殖；

2. BHK-21 表幼倉鼠細胞株；PK 表豬腎臟細胞株；ST 表豬睪丸細胞株；Vero 表非洲綠猴腎臟細胞株；NCI-H1299 表人肺癌細胞株。



表 3、國內以細胞分離水疱性病原的判別基準。

細胞種類			Ag-ELISA (病毒分離後)	RT-PCR(FMDV SVDV, SVV)	結果判讀
BHK-21 (任一種細胞)	EBK	Sty	FMD" +"		口蹄疫病毒
-	-	+	SVD" +"		豬水疱病病毒
+	+	+	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
-	+	+	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
+	-	+	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
+	+	-	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
+	-	-	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
-	+	-	FMD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
-	-	+	FMD 或 SVD" -"	SVV" +"	矽尼卡谷病毒
+	+	+	FMD 或 SVD" -"	-	將檢體另外接種於 Vero 單層細胞並立即進行 VSV 及 VESV 之 RT-PCR 檢測。若 Vero 單層細胞出現 CPE，且 VSV 之 RT-PCR 結果為陽性，則判定為 VSV 陽性。
-	-	-		-	再經第二次繼代培養，若任一種單層細胞在接種後 72 小時均未出現 CPE，則判定為病毒分離陰性。

- 註：1. + 表該病毒可在該細胞增殖或檢測結果呈陽性反應；
 2. - 表該病毒不能在該細胞增殖或檢測結果呈陰性反應；
 3. BHK-21 表幼倉鼠細胞株；EBK 表胚牛腎臟細胞株；Sty 表豬睪丸細胞株；Vero 表非洲綠猴腎臟細胞株。
 4. FMD 表口蹄疫；SVD 表豬水疱病；SVV 表矽尼卡谷病毒；VSV 表水疱性口炎病毒；VESV 表豬水疱疹病毒。
 5. CPE 表細胞病變變化；RT-PCR 表反轉錄 - 聚合酶鏈反應。

表 4、國內以 RT-PCR 方法檢測水泡性病原的判別基準。

RT-PCR 檢測之病毒標的					結果判讀	
FMDV	SVDV	SVV	VSV	VESV	初判	確診
+	-	-	-	-	口蹄疫病毒	Ag-ELISA” +” 或產物核酸定序
-	+	-	-	-	豬水疱病病毒	Ag-ELISA” +” 或產物核酸定序
-	-	+	-	-	矽尼卡谷病毒	產物核酸定序
-	-	-	+	-	水疱性口炎病毒	產物核酸定序
-	-	-	-	+	豬水疱疹病毒	產物核酸定序

- 註：1. +表 RT-PCR 結果產生該病毒特異性核酸片段即陽性反應；
 2. -表 RT-PCR 結果未產生該病毒特異性核酸片段即陰性反應；
 3. 產物核酸定序結果之確診，尚可判別病毒株之基因型或血清型。





圖 1、豬隻感染口蹄疫病毒的臨床表徵 - 左圖鼻吻部出現水泡病變；右圖蹄冠部出現水泡病變。



圖 2、豬隻感染豬水疱病病毒的臨床表徵 - 左圖蹄冠部出現水泡病變；右圖副蹄冠部出現水泡病變。



圖 3、豬隻感染砂尼卡谷病毒的臨床表徵 - 左圖蹄冠部出現水泡病變；右圖副蹄冠部出現水泡病變。

參考文獻

1. Van Maanen C. (1990). A complex-trapping-Blocking (CTB) ELISA, using monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies directed against foot and mouth disease types A, O and C. 1. Method and characteristics. *Vet. Microbiol.*, 24, 171-178.
2. W. Vangrysperre and K. De Clereq (1996) Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch Virol* 141:331-344.
3. World Organization for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.1.5. Foot and Mouth Disease, 2012.
4. World Organization for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.1.19. Vesicular Stomatitis, 2010.
5. World Organization for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.8.9. Swine Vesicular Disease, 2008.
6. J.F. Edwards, R.J. Yedloutschnig, A.H. Dardiri and J.J. Callis. (1987) Vesicular exanthema of swine virus-isolation and serotyping of field samples. *Can J Vet Res* 51: 358-362.
7. Ming Yang, Rebekah van Bruggen, Wanhong Xu. (2012) Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. *J Vet Diagn Invest* 24(1): 42–50.