

2003年台灣動物病例之電子顯微鏡技術檢診統計與分析

郭舒亭* 鄭明珠 丁履紉 李敏旭 賴治民 劉育宗 陳燕萍 蕭終融

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 利用電子顯微鏡（電顯）技術直接觀察檢體，藉著觀察病原特異性形態、大小的不同來做為動物疾病初步快速診斷的依據。電顯技術負染色法的運用，只要檢體病原濃度達到一定程度，負染色法簡單快速的處理流程及電顯的觀察診斷，對疾病的控制有相當重要的貢獻。本年度共接受禽類、草食動物、水產動物、豬及其他類別動物檢體共1,641件檢體以負染色法檢驗。4件水產動物及5件禽類檢體以超薄切片法檢驗。3件水產動物檢體以免疫膠體金法檢驗。觀察到Paramyxoviridae、Orthomyxoviridae、Rhabdoviridae、Caliciviridae、Nodaviridae等共15種不同的病毒科，並將其病毒圖像拍照存檔，做為診斷疾病輔助資料之一。

關鍵字：超薄切片術,負染色術,免疫膠體金,動物性疾病

緒 言

過去的一二十年，穿透式電顯已成為診斷病毒學的重要工具之一。負染色法技術的發展與建立促進了電顯使用率的增加〔4,7〕，此技術在處理檢體上簡單快速，不僅可直接觀察所有的生物體組成物及體液，且當觀察到特異性病原時，這個結果是明確而不會混淆〔3,6〕。因此觀察重點要放在加強疾病病原的確認與排除檢體中非病原性物質，這點端賴操作者專業背景及經驗累積〔1,4,6〕。

負染色法操作簡單快速且其解析力強，可於1小時內得到結果，適用於病毒性、細菌性疾病的診斷，尤其是應用在病毒性疾病〔5,6〕。病毒的結構多為對稱性，包含立方對稱、螺旋對稱及複合性對稱結構。除了對稱性結構不同可做區別外，病毒結構構

成病毒顆粒的大小由15 nm至450 nm等不同的差異。此外病毒封套之有無或其它病毒結構特性之差異，都可以利用負染色法在電子顯微鏡下觀察到，進而達到初步診斷的目地〔1,2,5〕。

除了負染色法常應用在輔助疾病診斷上外，超薄切片法也是另一個穿透式電顯技術，運用在觀察組織顯微變化及病原在細胞內增殖複製過程等現象的利器〔3,4,6〕。其操作流程繁瑣、複雜且耗時較久，不利於臨床上疾病診斷在時間上的要求，但對於疾病發生之後，有助於探討檢體組織細胞顯微變化及病原與組織之間的關係〔3,4〕。

材料與方法

檢體前處理：

送檢檢體（病材乳劑、糞材、培養液、尿囊液或組織液）共1,641件，送檢人員先將乳劑、糞材等檢體以3,000×g離心10分鐘處理後，取上清液100μL做為電顯負染色法觀察檢體用。其他如培養液、尿

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所
成單位如蛋白衣（capsid）之數量及其排列疏密之不同，也會造

囊液等檢體則直接取100 μ L 做為電顯負染色法觀察檢體用。

電顯負染色法處理：

送檢檢體經過檢體前處理後取適量做超高速離心90,000 $\times$ g 離心10分鐘，去除上清液。加入適量中性蒸餾水，充分溶解沉澱物。加入等量2% PTA (phospho-tungstic acid；磷鎢酸) 染色劑充分混合，取10 μ L 混合液滴在鍍有碳及膠膜 (collodion) 的銅網片上。再以 Hitachi-600 穿透式電顯加以觀察。

電顯超薄切片技術處理：

按照超薄切片技術處理步驟固定好之檢體依序經 PB (phosphate buffer；磷酸緩衝液) 清洗三次、四氧化銨固定2小時、PB 清洗三次、酒精脫水、Epon 數指包埋、組織超薄切片、鉛鉍雙重染色後，再以 Hitachi-600 穿透式電顯加以觀察。

電顯免疫膠體金技術處理：

檢體與特異之抗血清於37°C作用1小時後，放置4°C作用至隔日。作用後之檢體以0.1 M PB+5% BSA (bovine serum albumin；牛血清白蛋白) 洗3次，再與蛋白質 A 膠體金或蛋白質 G 膠體金於4°C作用4小時，最後依照電顯負染色法處理，再以 Hitachi-600 穿透式電顯加以觀察。

結 果

2002年共接受1,641件檢體以負染色法檢驗，結果如表1~4。另外4件水產動物及5件禽類檢體以超薄切片法檢驗；3件水產動物檢體以免疫膠體金法檢驗。在負染色法部分，禽類檢體1,005件，共檢驗出包括 *Paramyxoviridae*、*Orthomyxoviridae*、*Coronaviridae*、*Adenoviridae*、*Poxviridae*、*Parvoviridae* 等，共10種病毒科 (Table 1)。草食動物檢體 221 件，共檢驗出包括 *Coronaviridae*、*Rhabdoviridae*、*Reoviridae* 等，共7種病毒科及披衣菌 (Table 2)。水產動物檢體244件，共檢驗出包括 *Herpesviridae*、*Iridoviridae*、*Reoviridae*、*Birnaviridae* 等，共5種病毒科 (Table 3)。豬檢體40件，共檢驗出包括 *Togaviridae* 及 *Reoviridae*，共2種病毒科 (Table 4)。其他類檢體 131 件，檢驗出 *Parvoviridae*、*Caliciviridae*、*Togaviridae* 等，共 6 種病毒科。3件水產動物檢體檢驗出 *Iridoviridae* 病毒，以免疫膠體金法檢驗，因為抗原力價不足及檢體遭細菌污染導致實驗結果並不理想。另外有4件水產動物檢體及5件禽類檢體以超薄切片法檢驗，但切片結果並未發現可疑之病毒顆粒。

Table 1. EM negative stain result of poultry sample in 2002

Month Pathogen	Jun	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Pathogen numbers
Paramyxoviridae		2		4	2	3	1	2	5	1	2	12	34
Orthomyxoviridae	1			5	3	5	10	2		1	4	2	33
PMV or OMV					3	3			3	1		1	11
Parvoviridae						8							16
Reoviridae and Birnaviridae			8							1			1
Coronaviridae	3	4	4		1	1		6	4	11	2	6	42
Reoviridae			1	2				1					4
Adenoviridae			5					1					6
Poxviridae		3		1									4
Birnaviridae			4										4
No particular particle	94	51	110	101	67	46	99	54	46	49	83	50	850
sample numbers	98	60	132	113	76	66	110	66	58	64	91	71	1,005

Table 2. EM negative stain result of herbivore sample in 2002

Month Pathogen	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Pathogen numbers
Rhabdoviridae	1		1			1			1				4
Adenoviridae		1								1	1		3
Herpesviridae										1			1
Reoviridae				1	2	2					3	4	12
Coronaviridae												8	8
Retroviridae			1										1
Papovaviridae							1						1
Chlymedia							1						1
No particular particle		6	24	9	15	47	28	4	11	15	5	26	190
sample numbers	1	7	26	10	17	50	30	4	12	17	9	38	221

Table 3. EM negative stain result of aquatic animal sample in 2002

Month Pathogen	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Pathogen numbers
Reoviridae or Birnaviridae								2	1	1			4
Herpesviridae	1			1			3					2	7
Herpesviridae and Reoviridae	1												1
Reoviridae					1	2	1	1			1		6
Birnaviridae					2	3	1	1	1			3	11
Iridoviridae		1	1		3	3	6	3				2	19
Nodaviridae	1		3			3							7
No particular particle		2	3	10	35	13	26	3	14	26	23	34	189
sample numbers	3	3	7	11	41	24	37	10	16	27	24	41	244

Table 4. EM negative stain result of swine sample in 2002

Month Pathogen	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Pathogen numbers
Togaviridae							3						3
Reoviridae								2					2
No particular particle	15	1				2	3		8	1		5	35
sample numbers	15	1	0	0	0	2	6	2	8	1	0	0	40

多的研究人員投注心力。以本實驗室為例，2002年接獲水產動物檢體244件比較去年138件增加了106件，其中新發現了幾種的病毒性疾病。3月份從本所魚病室送檢檢體（1~1.5月齡石斑魚檢體接種之細胞培養

液）中，發現有 *Nodaviridae* 存在，如圖1所示，經魚病室深入研究證實為魚類 VNN（viral nervous necrosis）之病原。

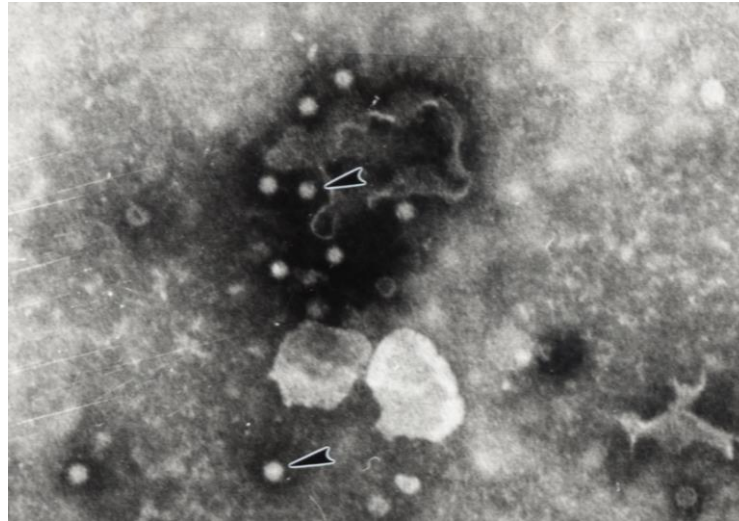


圖1 魚類 VNN 病毒顆粒形態，Nodavirus 形態是屬於二十面體立方對稱，無封套（envelope），如箭頭所指（100,000×）。

12月份從本所魚病室送檢檢體（錦鯉檢體乳劑）中，發現 *Herpesviridae* 之病毒顆粒存在，如圖2所示。經魚病室深入研究以 PCR 及基因定序證實，所觀察到之病毒顆粒為 Herpesvirus。因錦鯉養殖業損失嚴

重（得病之錦鯉養殖場有高達80%死亡率），如果證實此病毒為死亡魚群之病原，此案件結果將有更重要之意義。

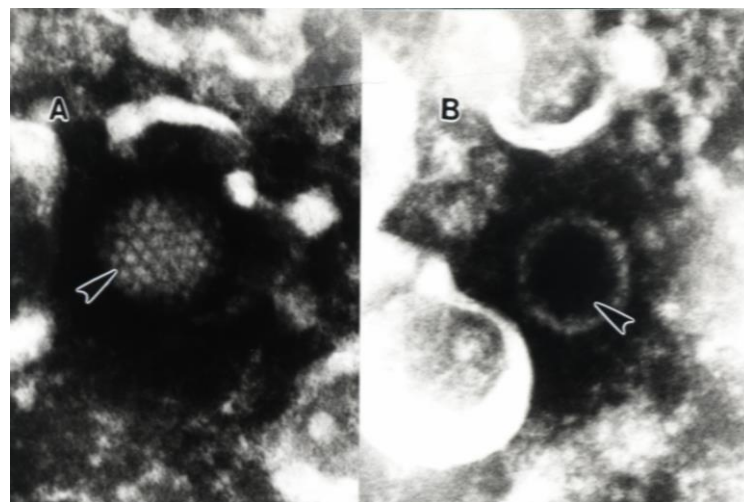


圖2 錦鯉之 Herpesviruse 病毒顆粒形態，Herpesvirus 形態是屬於二十面體立方對稱，有封套（envelope）。A 圖之病毒顆粒封套已脫落，只見排列整齊的衣殼粒（capsomere），形成之蛋白衣（capsid），如箭頭所指（150,000×）。B 圖之病毒顆粒封套也已脫落，蛋白衣有破損使得染劑灌入，所以蛋白衣中央部分呈現黑色，如箭頭所指（150,000×）。

在豬疾病方面，七月份本所豬瘟研究組接獲一石頭豬檢體，經 PCR 檢測及細胞接種，發現有 JE virus (Japanese encephalitis virus) 存在，但因細胞接種之結果 (CPE 形成時間) 有異，將接種病材之細

胞培養液送電顯室檢驗，僅發現 *Togaviridae* 病毒顆粒存在，如圖3所示。經豬瘟研究組深入研究證實此病毒顆粒為豬鷺山病毒 (Sagiyama virus)，為台灣首次發現。

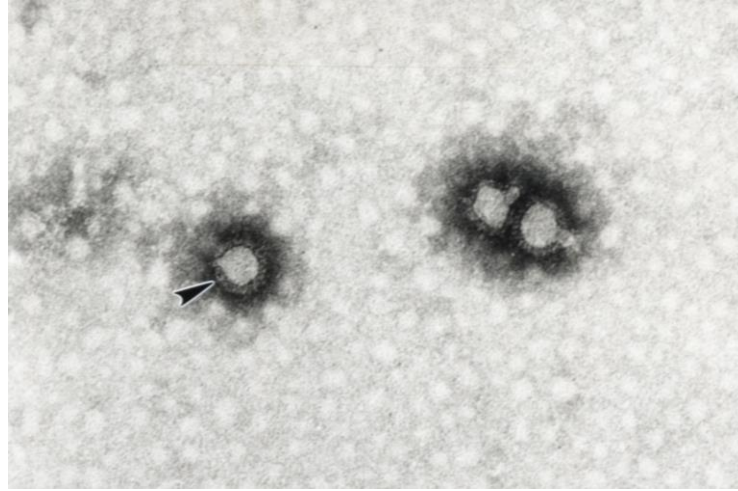


圖3 豬鷺山病毒 (Sagiyama virus) 病毒顆粒形態，典型 *Togaviridae* 結構形態，如箭頭所指，為有封套之二十面體立方對稱病毒，封套上有突起物，如箭頭所指 (100,000 $\times$)。

在其他檢體方面，2月份竹南分所檢驗疫苗用之家兔，在注射某廠商之兔化豬瘟疫苗後，發生家兔急性死亡、內臟有出血病變之情形，乳劑檢體經電顯檢察發現有 *Caliciviridae* 病毒顆粒存在。經竹南分

所生檢系深入研究 (PCR 及 ELISA 檢測)，證實發病死亡兔感染了兔出血熱病毒 (RHD, rabbit hemorrhagic disease virus) [8]，如圖4所。初步推論某廠商之兔化豬瘟疫苗有 RHD 病毒污染問題。

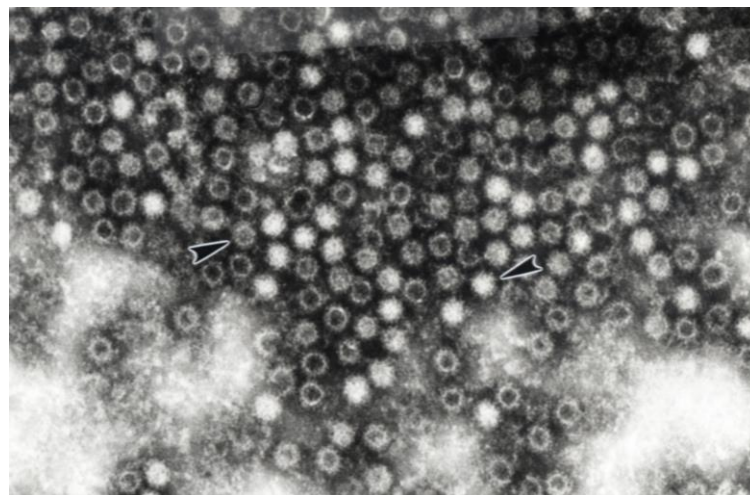


圖4 兔出血熱 RHD 病毒顆粒形態，*Caliciviridae* 病毒顆粒為正二十面體立方對稱形態，如箭頭所指 (100,000 $\times$)，許多此類病毒因其表面擁有具特徵性的杯狀凹陷，故稱為杯狀病毒。

當面對新的疾病發生時或不能確定為何種病原時，電子顯微鏡技術的各種檢驗方法往往可以在最

短的時間內，提供一些診斷的依據及方向。

與其它的疾病診斷檢驗方法比較起來，電顯技

術（如負染色法）在檢驗速度上、準確度及敏感度上都有很好的表現，此外電顯所得到的數據及資料都是具有高教學價值，例如病原圖像的呈現，也是極具說服力的診斷依據之一。然而昂貴的機器設備、嚴格的設施環境要求及專業操作人員培訓不易，這也是電顯技術在實際運用上的困境。

雖然診斷的技術不斷地往更快速、更靈敏、更正確的方向邁進，但面對越來越多不具典型臨床病變、早已存在但以前未曾發現或是外傳而來的新疾病等等狀況，檢驗人員有時也會有不知該如何下手的窘境，電顯技術可在第一時間提供疾病初步的診斷方向，使得對後續的研究工作及疾病的控制更為順利，有著重大的貢獻及意義。

參考文獻

1. 陳家全，李家維，楊瑞森。生物電子顯微鏡學，國科會精儀中心，科儀叢書。4, 1991。
2. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Salf YM.. Disease of poultry 10th ed., Ames, Iowa, USA 1991.
3. Doane FW, Anderson N. Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge University Press, 1987.
4. England JJ, Reed DE. Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viruses of veterinary importance. Cornell Vet 70: 125-136, 1980.
5. Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. Diagnostic electron microscopy of feces. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. J Clin Pathol 27: 608, 1974.
6. Glauert AM. Practical methods in electron microscopy. North-Holl and Publishing Company, 1997.
7. Stefan S, Biel DM.. Diagnostic virology - the need for electron microscopy: a discussion paper. J Clin Virol 22: 1-9, 2001.
8. Ohlinger VF, Haas B, Thiel HJ. Rabbit Hemorrhagic Disease: characterization of the causative calicivirus. Vet Res 24:103-16, 1993.

Diagnosis of Animal Pathogens by Electron Microscopy Techniques

Kuo Shu-ting*, Ming-Chu Chen, Lu-Jen Ting, Min-Shiuh Lee, Jyh-Mirn Lai, Yu-Tsung Liu,
Yen-Ping Chen, Jong-Rong Shiau

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

SUMMARY In this report, unique morphology and sizes of pathogens are observed by TEM technique and used as a basis for preliminary diagnosis of animal diseases. The negative staining technique contains advantages of simplified treatment and improved TEM observation, providing improved efficiency for diagnosis. This report used negative staining technique to examine 1,641 samples collected from poultry, ruminants, aquatic animals, pigs and dogs. Furthermore, 9 out of the 1,641 samples were applied to electron microscopy with ultrathinsection examinations, and 3 were applied to the immunogold examinations. We observed 15 families of virus including *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* and *aliciviridae*, Nodavirus. These virus pictures are archived as references for future references.

Keywords: *Ultrathinsection, negative stain, immunogold examination, animal disease*

* Corresponding Author

Animal Health Research Institute