

利用電子顯微鏡技術診斷動物疾病

郭舒亭、鄭明珠、丁履紉、林德田、李敏旭、劉育宗、賴治民、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。電子顯微鏡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、犬共 1,121 件檢體以負染色法檢驗。19 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，觀察到包括 *Paramyxoviridae*、*Orthomyxoviridae*、*Rhabdoviridae*、*Circoviridae* 等共 15 種不同的病毒科，並將重要疾病病毒圖像拍照存檔，做為診斷疾病輔助資料之一。

關鍵字：超薄切片術、負染色術、動物性疾病

緒 言

過去的一二十年，穿透式電子顯微鏡已漸漸成為診斷病毒學常被利用的一重要工具，而電顯使用率的增加主要是因為負染色法技術的發展與建立〔5,8〕，這種技術在處理檢體上簡單快速，幾乎所有的生物體組成物及體液皆可被直接拿來觀察，而當電子顯微鏡觀察到特異性病原時，這個結果是明顯肯定而且不會混淆〔4,7〕。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〔1,5,7〕。

負染色法操作簡單快速解析力強，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〔6,7〕。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之外，病毒結構構成單位如蛋白衣 (capsid) 其數量及排列疏密之不同，也會造成病毒顆粒的大小由 15 nm 至 450 nm 等等不同的差異。此外病毒封套之有無與其它個別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〔2,3,6〕。

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子顯微鏡技術，運用在觀察組織顯微變化及病原在細胞內繁殖複製過程等等現象的利器〔4,5,7〕，其操作流程繁瑣而複雜且耗時較久，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，檢體組織細胞顯微變化及病原與組織之間的關係，能有更進一步研究探討的空間〔4,5〕。

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、組織液) 共 1,121 件，送檢人員先將乳劑、糞材等檢體以 3,000 rpm 離心 10 分鐘處理後，取上清液 100 ~ 200 μ L 做為電顯負染色法觀察檢體用。其他如培養液、尿囊液等檢體則直接取 100 ~ 200 μ L 做為電顯負染色法觀察檢體用。

加以觀察。

電子顯微鏡負染色法處理：

送檢檢體經過檢體前處理後取適量做超高速離心 90,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液。加入適量中性蒸餾水（視離心下來沉澱物量多寡而定），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 μL 混合液滴在鍍有碳及膠膜（collodion）的銅網片上。以 Hitachi-600 穿透式電子顯微鏡加以觀察。

電子顯微鏡超薄切片技術處理：

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、四氧化銻固定、PB 清洗三次、酒精脫水、Epon 包埋、切片、鉛鉍雙重染色後，以 Hitachi-600 穿透式電子顯微鏡加以觀察。

電子顯微鏡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 0.1M 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，最後依照電子顯微鏡負染色法處理，再以 Hitachi-600 穿透式電子顯微鏡

結 果

2001 年共接受 1,121 件檢體以負染色法檢驗，結果如表 1~表 5。另外 19 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 751 件，共檢驗出包括 *Paramyxoviridae*、*Orthomyxoviridae*、*Coronaviridae*、*Adenoviridae*、*Herpesviridae*、*Parvoviridae* 等，共 12 種病毒科，草食動物檢體 147 件，共檢驗出包括 *Coronaviridae*、*Rhabdoviridae*、*Reoviridae* 等，共 5 種病毒科，水產動物檢體 138 件，共檢驗出包括 *Herpesviridae*、*Iridoviridae*、*Reoviridae*、*Birnaviridae* 等，共 6 種病毒科，豬檢體 78 件，共檢驗出包括 *Herpesviridae*、*Retroviridae*、*Reoviridae*、*Circoviridae*，共 4 種病毒科，犬檢體 7 件，檢驗出 *Herpesviridae* 1 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，因為抗原力價不足導致實驗結果並不理想。另外有 19 件禽類檢體以超薄切片法檢驗，但因為與預期結果有所出入，所以沒有再進行下一步有關電顯之試驗。

表 1 2001 EM negative stain result of poultry sample

Pathogeny	Month												Pathogeny numbers
	Jun	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Paramyxoviridae		4	9	14				9	3	1	4	18	62
Orthomyxoviridae			2							2	1	1	6
PMV or OMV				1	1	15				3			20
Parvoviridae													
Enteroviridae and Parvoviridae		4	5	2	2	2	1	1		1			16
			2	7									9
Picronaviridae							4	3					7
Coronaviridae	3	4	2	3	7			4	6		14	7	50
Reoviridae										1			1
Adenoviridae			7	12									19
Herpesviridae					1								1
Poxviridae										2	2		4
Retroviridae		2											2
Birnaviridae		1											1
No particle particular	23	30	69	27	48	10	33	83	77	51	32	70	553

sample numbers	26	45	96	64	59	27	38	100	86	61	53	96	751
----------------	----	----	----	----	----	----	----	-----	----	----	----	----	-----

表 2 2001 EM negative stain result of herbivore sample

Pathogeny	Month												Pathogeny numbers
	Jun	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Rhabdoviridae						2			1	1	2		6
Adenoviridae						2							2
Reoviridae						2		1	2				5
Coronaviridae							2			1		1	4
Poxiviridae						1							1
No particle particular		14	2	3	35	23	6	16	6	21	3		129
sample numbers	0	14	2	3	35	30	8	17	9	23	5	1	147

表 3 2001 EM negative stain result of aquatic animal sample

Pathogeny	Month												Pathogeny numbers
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Picornaviridae											4		4
Herpesviridae		1	3				1	2					7
Herpesviridae and Reoviridae												2	2
Reoviridae	1					4	1	2			1	3	12
Birnaviridae							1						1
Iridoviridae	3	4	8	1		3	2	3	6	5	1	10	46
Rhabdoviridae								1					1
No particle particular	6		12	3	1	2	8	4	14	4		11	65
sample numbers	10	5	23	4	1	9	13	12	20	9	6	26	138

表 4 2001 EM negative stain result of swine sample

Pathogeny	Month												Pathogeny numbers
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Retroviridae	1												1
Reoviridae						1	6	1			4		12
Herpesviridae	2			1		1	1			7			12
Circoviridae			1										1
No particle particular	10		9	1	1	6	11	5		4	4	1	52
sample numbers	13	0	10	2	1	8	18	6	0	11	8	1	78

表 5 2001 EM negative stain result of canine sample

Pathogeny	Month												Pathogeny numbers
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
Herpesviridae											1		1
No particle particular											6		6
sample numbers	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7

討 論

依送檢體性質區分為兩大類，一類為病性鑑定檢體，一類屬於試驗研究性質檢體，在禽類檢體方面無論是屬於那一類，*Paramyxoviridae* 是

最常被觀察到的病毒科，配合其它實驗室方法，發現這些含 *Paramyxoviridae* 病毒顆粒的檢體，如圖 1 所示，幾乎都是屬於新城病 (Newcastle disease ; ND) 的檢體，可見得 ND 對台灣禽類仍是影響甚大的疾病之一〔2〕。

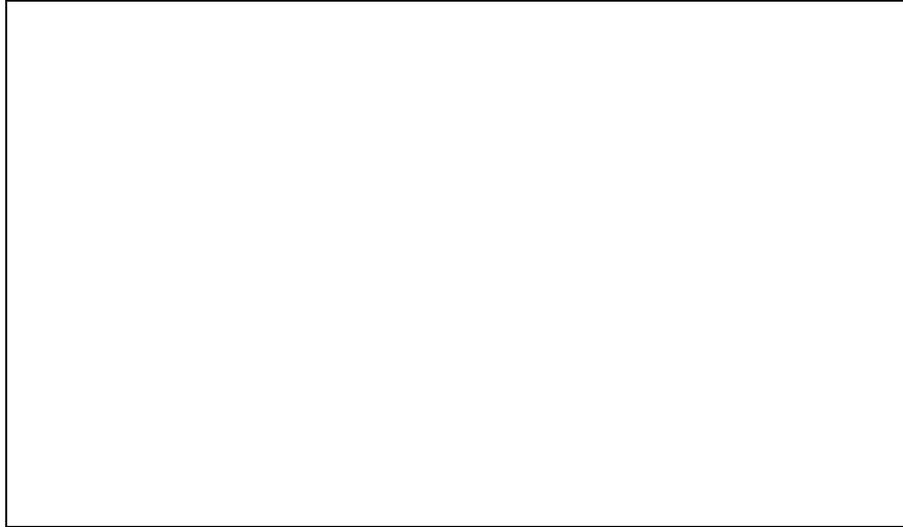


圖 1 ND 病毒顆粒形態，*Paramyxoviridae* 為多形性或球形結構形態，其核蛋白衣（nucleocapsid）在電顯觀察下呈現出特徵性的魚脊狀（herring bone）形態，如箭頭所指（100,000 \times ）。

在草食動物方面，牛流行熱（bovine ephemeral fever；BEF）也是一個棘手的問題，BEF 的病原 *Rhabdoviridae* 是一種不容易分離得到的病毒，今年台灣不幸爆發 BEF 疫情，病牛檢

體送至本系進行多項檢測及病毒分離，最後以細胞株 BHK-21 分離到 BEF 病原，並透過電子顯微鏡觀察拍攝到 BEF 病毒顆粒形態，如圖 2 所示。

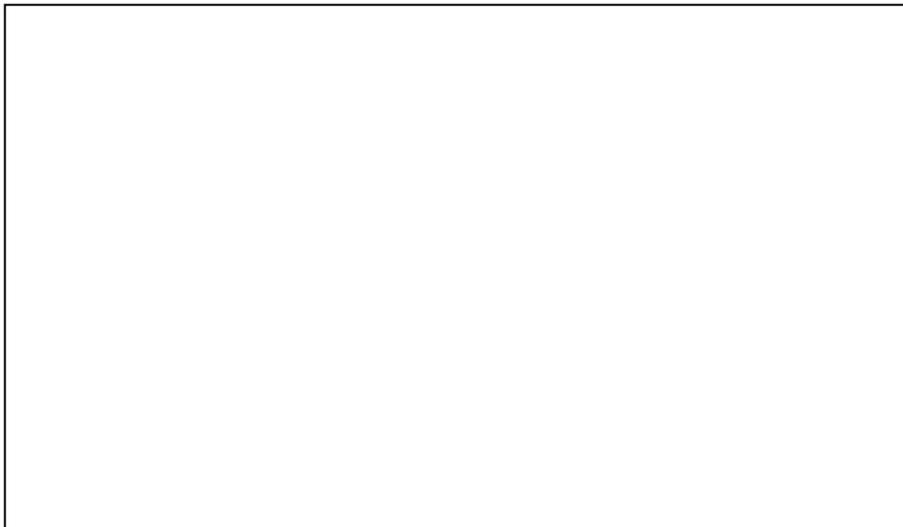


圖 2 BEF 病毒顆粒形態，典型 *Rhabdoviridae* 子彈型結構形態，如箭頭所指（100,000 \times ）。

在豬疾病方面，環狀病毒感染症是目前在台

灣逐漸受到重視的疾病之一，病原 *Circoviridae*

病毒顆粒極小，僅為 15 nm ~ 18 nm 非常不易觀察得到，2001 年 3 月台北縣防治所送檢豬檢體，經 PCR 檢測為 Circoviridae 病毒陽性檢體乳劑

中，電顯也成功觀察到環狀病毒顆粒存在，如圖 3 所示。



圖 3 豬環狀病毒病毒顆粒形態，環狀病毒顆粒為正二十面體形態，如箭頭所指（100,000 \times ）。

在診斷時，我們常常要與一些不明病原奮鬥，尤其是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，此外電顯所觀察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重要缺失。

雖然診斷的技術不斷地往更快速、更靈敏、更正確的方向進步，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. 呂榮修。禽病診斷彩色圖譜。中華民國養雞協會。1995。
3. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Salf YM. Disease of poultry 10th ed., Ames, Iowa, USA 1991.
4. Doane FW, Anderson N. Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge University Press, 1987.
5. England JJ, Reed DE. Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viruses of veterinary importance. Cornell Vet 70: 125-136, 1980.
6. 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.
7. Glauert AM. Practical methods in electron microscopy. North-Holl and Publishing

Company, 1997.

J Clin Virol 22: 1-9, 2001.

8. Stefan S, Biel DM. Diagnostic Virology - the need for electron microscopy: a discussion paper.

Diagnosis of Animal Diseases by the Electron Microscopy

Shu-ting KUO^{*}, Lu-Jen TING, Min-Shiuh LEE, Jyh-Mirn LAI, Ming-Chu CHEN,
Yu-Tsung LIU, Der-Tyan LIN, 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 the 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 to examine 1,121 samples collected from poultry, ruminants, aquatic animals, pigs and dogs. Furthermore, 19 out of 1,121 samples were applied to electron microscopy with ultrathinsection examination, and 3 samples were applied to immunogel method on immunogold examination. A total of 15 viridae were observed, including *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* and *Circoviridae*. These virus pictures are archived as references for future diagnosis.

Keywords: Ultrathinsection, Negative stain, Animal disease

*Corresponding Author
National Institute for Animal Health