

應用間接免疫過氧化酶技術在家禽中樞神經系統病毒性疾病之診斷

李淑慧* 鍾明華 呂榮修 林地發 鄭明珠 楊喜金

台灣省家畜衛生試驗所 生物研究系

摘要 免疫過氧化酶染色技術（直接及間接法），於人工感染家禽流行性感冒（Avian influenza；AI）、新城雞病（Newcastle disease；ND）及家禽腦脊髓炎（Avian encephalomyelitis；AE）經福馬林固定、石臘包埋組織切片，可染出特異病毒抗原，比較其病毒分離、組織病變及免疫過氧化酶染色結果皆具一致性，應用於野外病例結果亦然，該免疫過氧化酶染色技術已可供野外病例常規診斷用，因其適用於石臘組織切片，可永久保存為回顧性及探討致病機轉等試驗研究極佳之工具。

關鍵詞：免疫過氧化酶染色技術，新城雞病，家禽腦脊髓炎，家禽流行性感冒

緒言

本省家禽中樞神經系統病毒性疾病所引起之非化膿性腦膜腦炎，包括新城雞病，家禽腦脊髓炎及家禽流行性感冒等病毒性疾病其組織病理形態學之病變相當類似，同時其病變出現率不一，常有複合感染疾病發生，若單靠病理形態學之診斷，不易區別診斷，常需配合血清學技術和病毒分離結果才能確診，但上述二項試驗均耗時費事，對於急性病例之防疫工作，實乃緩不濟急。故一系列重要疾病之免疫化學常規染色法之建立實有必要，有助於禽病之監控及診斷。

本文旨在以人工感染方式，配合臨床症狀、組織病變及病毒分離結果，應用免疫過氧化酶技術偵測經福馬林固定、石臘包埋組織切片中之病毒抗原，建立家禽流行性感冒病毒、新城雞病及家禽腦脊髓炎三種疾病常規免疫染色技術，供爾後禽病診斷之用。

材料與方法

供試病毒：

分讓自台灣省家畜衛生試驗所疫學系保存之三株病毒：

AI virus：A / duck / Taiwan / 72 (H₆N₁)，HA titer 1：160，病毒力價：10^{6.5} EID₅₀ / ml。

ND 佐藤株，HA titer 1：640，病毒力價：10^{7.5} EID₅₀ / ml。

AE virus：Van Roekel E34 毒株，接種於 6 日齡 SPF 雞胚製成 10 倍雞胚乳劑行腦內接種 0.1 ml 於 3 日齡 SPF 雞。

供試雞隻：

四週齡 SPF 雞，30 隻。

三日齡 SPF 雞，10 隻。

病毒分離：

ND：採取病材製成 10 倍乳劑接種於 10 日齡 SPF 雞胚，逐日觀察，抽取 48 小時死亡之雞胚尿囊液，雞紅血球凝集反應呈陽性，再經 HI test 確認為新城雞病病毒。

AI：採取各臟器，以 YLE 組織培養液，10 倍

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

階段稀釋後，接種 0.4 ml 於雞腎細胞，觀察 7 日，有無 CPE 或血球凝集性，如呈現 CPE 或血球凝集性陽性者，即判定為陽性。

AE：病雞腦部組織，製成 5~10 倍乳劑，接種 0.1 ml 於 2~3 日齡雞胚腦內，經觀察 10 天後如有雞胚之腳趾病變，則判定為陽性。

特異免疫血清之製備：

將 AI 及 ND 病毒於雞胚胎增殖、抽取尿液經硫酸銨沉澱，透析後濃縮，以 3 mg 抗原混以等量 Freund's 完全佐劑皮下免疫兔子，一個月後每間隔二週以 6 mg 抗原混以等量 Freund's 不完全佐劑免疫，一個月後採血收集之。

將 AE 病毒於 Chicken embryo fibroblast (CEF) 增殖、經硫酸銨沉澱透析後濃縮，以 2 mg 抗原混以等量 Freund's 完全佐劑皮下免疫兔子，一個月後每間隔二週以 4 mg 抗原混以等量 Freund's 不完全佐劑免疫，一個月後採血收集之。

人工感染試驗：

以 AI、ND 病毒分別接種四週齡 SPF 雞，30 隻分下列三組分別攻毒，逐日觀察臨床症狀，定期剖解採材。所有實驗雞皆飼養於隔離完全附抽風設備之試驗動物舍，實驗期間及完成後皆經過徹底消毒程序。

第一組 10 隻，AI 病毒行鼻腔接種，0.3 ml / 隻。

第二組 10 隻，ND 病毒行鼻腔接種，0.3 ml / 隻。

第三組 10 隻，對照組。

以三日齡 SPF 雞 10 隻，行腦內接種、逐日觀察臨床症狀，遇神經症狀出現者，即予剖檢採材。

剖檢雞隻除例行檢查外亦將中樞神經系統及重要臟器分二部份採材：

無菌操作方式採材，以供病毒及細菌之分離。

固定於 10 % 中性福馬林溶液，供石臘包埋，製做組織病理切片行 H&E 染色及免疫過氧化酶染色。

渠草根過氧化氫酶之標幟：

按 Wilson and Nakane 法^[19]，進行兔抗 AE、

ND 及 AE 病毒之高免血清渠草根過氧化氫酶 (Horseradish peroxidase; HPRO) 之標幟。

間接免疫過氧化氫酶染色法：

分別使用福馬林固定，石臘包埋組織切片進行染色。

將切片通過 0.5 % H₂O₂ methanol，10 分鐘，抑制內源性過氧化酶作用。

0.1 % 胰蛋白酶溶液，30 分鐘，37 °C 消化。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

兔抗 AI、ND 或 AE 病毒抗血清，感作 37 °C，1hr。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

山羊抗兔 IgG 標示 HRPO (Jackson)，感作 37 °C，1hr。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

於 3.3'-Diamino benzidine (DAB) 溶液中染色 10 分鐘。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

Hematoxyline 10 秒。

水洗，脫水，透明，封片。

直接免疫過氧化氫酶染色法：

應用自行標示之渠草根過氧化酶兔抗 AI、ND 及 AE 特異血清，進行免疫染色，步驟與間接法類似，較簡單可節省水洗次數、抗體作用時間，減少切片之損傷。

將切片通過 0.5 % H₂O₂ methanol，10 分鐘，抑制內源性過氧化酶作用。

0.1 % 胰蛋白酶溶液，30 分鐘，37 °C 消化。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

兔抗 AI、ND 或 AE 病毒抗血清標示 HRPO (自製)，感作 37 °C，1hr。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

於 3.3'-Diamino benzidine (DAB) 溶液中染色 10 分鐘。

Tris-Saline Buffer 洗 3 次。

Hematoxyline 10 秒。

水洗，脫水，透明，封片。

臨床病例之檢查：

野外病例臨床症狀及疫情疑似 AI、ND 及 AE 之病例 30 件，依上述步驟進行組織病變檢查、免疫染色及病毒分離。

結 果

家禽流行性感胃病毒人工感染試驗結果：於接種第二天起，陸續呈精神沉鬱、厭食、下綠色便及蹲伏等症狀，第四日起可見明顯呼吸症狀包括開口呼吸、囉音、流淚及發熱等症狀，部份雞隻雞冠、肉垂及眼瞼潮紅及浮腫、腳趾皮鱗部呈局部出血斑或退色水腫、腳掌皮下組織含漿液性炎症滲出液，剖檢病變以肺水腫，心肌散發白色橫紋，腎退色腫大、腎小葉分隔明顯，腺胃粘膜、心冠狀溝脂肪及腹部脂肪呈點狀出血等為主徵。

組織病變：中樞神經系統皆呈不同程度之非化膿性腦炎病變，包括局部壞死、腦軟化、噬神經作用、小神經膠細胞增生聚集、淋巴球性圍管現象及血管內皮細胞增生等病變，縱觀其於中樞神經系統分佈情形，無特異好發部位 (Table 1)，亦無特異病變可供單一形態學確診之用。除中樞神經系統之病變外，皮下組織呈明顯血管炎可見大量單核球及纖維素滲出物聚集。感染後三天之試驗雞可見腎小管上皮細胞輕度壞死，感染後第四天胰臟呈多發局部凝固樣壞死灶，實質可見少數淋巴細胞浸潤。大多數感染雞呈明顯心肌炎病變其壞死灶浸潤之細胞以大型單核球為主，另可見脾呈局部壞死灶、網狀內皮細胞輕度增生，腺胃粘膜及十二指腸粘膜局部出血。採取發病雞隻之重要臟器，經病毒分離結果皆可回收 AI 病毒 (Table 2)。

新城雞病病毒人工感染試驗結果：臨床症狀與 AI 感染組類似，但皮膚系統不見潮紅水腫情形，消化道之 payer's patch 處粘膜可見出血及潰瘍灶，此亦不同於 AI 感染組，其他臟器肉眼及組織病變皆與 AI 感染組無異。細察中樞神經系統之組織病變，無法與上述 AI 感染組區別之。故單靠組織病理形態學，不足以鑑別診斷新城雞病及家禽流行性感胃。採取發病雞隻之重要臟器，經病毒分離結果皆可回收 ND 病毒。

雞腦脊髓炎人工感染試驗結果：十隻三日齡 SPF 雞行腦內接種，8~9 日後陸續呈嗜眠、瞌睡、間歇性震顫及腳麻痺等症狀。剖檢不見肉眼病變，顯微病變以小腦及腰椎膨大部之運動神經細胞呈中心虎斑小體溶解 (Central chromatolysis) 病變最具特異性 (Fig 1)。

對照組：AI 及 ND 實驗組每日剖檢時對照組亦同時剖解一隻，無論臨床、肉眼及組織病變皆無任何有義意之病變。

間接免疫過氧化酶染色結果：

AI：將福馬林固定、石臘包埋組織切片經一連串脫臘、脫水、水洗程序後，依費法^(1,2)以 0.5 % H₂O₂ methanol 處理 30 分鐘 (可將內源性過氧化酶沉澱降為最低)、再加 10 % normal goat serum incubator 37 °C 30 分鐘、primary rabbit anti-AI serum 稀釋 100 X、secondary goat anti-rabbit IgG HRPO conjugated (Jasckson 出品) 稀釋 80 X、染色效果最好，經免疫染色後之組織切片以含 0.05 % 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB) 及 0.01 % H₂O₂ 之 Tris-HCl 0.05 M, pH 6.0 溶液染色 10 分鐘、以蘇木紫做背景染色。結果最早於 3DPI (Days post-inoculation) 雞腎組織雖僅見輕微腎炎病變，但於結構完整腎小管上皮細胞中可清晰染出黃褐色病毒抗原 (Fig 4)，4DPI 壞死心肌組織中亦可見病毒抗原，5DPI 呈局部壞死大腦組織之小神經膠細胞之核內及質內皆可見病毒抗原 (Fig 3)，此外胸腺、華氏囊、脾臟、十二指腸及臉部皮下組織等皆可染出病毒抗原 (Table 3)，縱觀免疫染色與組織病變及病毒分離結果皆具一致性 (Table 4)，故本免疫染色技術之特異性及敏感性是可確定的，但肺臟組織雖病毒分離率極高，但染色結果非特異性反應較為強烈，不易判讀，故肺臟組織較不適於本免疫染色技術。

ND：primary rabbit anti-ND serum 稀釋 100 X、secondary goat anti-rabbit IgG HRPO conjugated (Jasckson 出品) 稀釋 100 X、染色效果最好，染色結果見 (Table 5)，病雞之腎小管上皮細胞、十二指腸上皮細胞、心肌、華氏囊上皮細胞及腦組織切片中皆可染出黃褐色病毒抗原 (Fig 5, 6)，其免疫染色與組織病變及病毒分離結果皆具一致性。

AE：Primary rabbit anti-AE serum 稀釋 80 X、secondary goat anti-rabbit IgG HRPO conjugated (Jackson 出品) 稀釋 100 X 效果最好，AE 可於 8DPI 人工感染雞之大腦、小腦及脊髓之神經細胞內染出病毒抗原。(Fig 2) 其餘組織則無明顯陽性反應。免疫染色與組織病變及病毒分離結果皆具一致性。

直接免疫過氧化酶染色結果：

間接免疫染色過程較繁複且因水洗及血清感作時間長，易造成組織切片之損傷，往往至最後封片步驟時組織脫落，致使前功盡棄；故按 Wilson and Nakane 方法^[19] 自行標示渠草根過氧化酶 (Horseradish peroxidase)，行直接染色法，結果其特异性及敏感性與間接免疫染色技術一致，可節省試劑、時間及保存組織之完整性 (Table 6)。

野外病例檢驗結果：

自受檢病例中經組織病理形態及病毒分離結果確診為新城雞病病例，應用免疫過氧化酶染色技術皆可於腎臟及十二指腸上皮細胞中，染出特異病毒抗原 (Fig 7)。中樞神經系統雖有明顯非化膿性腦炎病變，但並不能偵測出病毒抗原，此與人工感染試驗結果一致，接種後 9 日

9 日試驗雞腦組織免疫染色亦為陰性、但腎及十二指腸皆可染出病毒抗原 (Table 5)，此亦與王^[20] 應用間接免疫染色法於野外病例腸上皮細胞偵測得病毒抗原之結果同，由此可知腎及十二指腸是偵測新城雞瘟病毒之重要處所，剖檢採材時不可忽略。

五例經確診為雞腦脊髓炎病例中，亦可於腦組織之神經細胞中染出病毒抗原 (Fig 2)，但腦部炎症反應強度與病毒抗原偵測陽性率不成正比，換言之，炎症反應最強烈者，反而免疫染色結果為陰性，似乎早期感染之病毒抗原較易偵測，此可能與病毒增殖時機有關，其真正原因須進一步探討。野外病例雞隻為三至六週齡，而人工感染試驗結果於接種後 8 日 (11 日齡) 即呈明顯特異病變，亦可應用免疫染色技術偵測出病毒抗原。

Table 1 Distribution of histopathologic lesions of central nervous system in chickens after avian influenza type A virus inoculation

| No. chicken | Days Post-inoculation | degree of lesions | | | | |
|-------------|--------------------------|-------------------|------------|------------|---------|-------------|
| | | Cerebral | Cerebellum | optic lobe | medulla | spinal cord |
| * 1 | 2 | - | - | + | ++ | ** - |
| 2 | 2 | + | ++ | - | + | - |
| 3 | 3 | ++ | + | ++ | ++ | + |
| 4 | 3 | - | ++ | ++ | + | NT |
| 5 | 4 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 6 | 4 | + | - | ++ | NT | NT |
| 7 | 5 | ++ | +++ | ++ | +++ | + |
| 8 | 5 | ++ | +++ | NT | NT | NT |
| 9 | 6 | +++ | ++ | ++++ | +++ | +++ |
| 10 | 6 | ++++ | ++++ | +++ | NT | + |
| 11 | 1 | - | - | - | - | - |
| 12 | 2 | - | - | - | - | - |
| 13 | 3 | - | - | - | - | - |
| 14 | 4 | - | - | - | - | - |
| 15 | 5 | - | - | - | - | - |
| 16 | 6 | - | - | - | - | - |

* : No. 1-10 were infected with AI virus. No. 11-16 were uninfected control.

** : - no lesion; + mild; ++ moderate; +++ severe; ++++ very severe

NT=not tested.

Table 2 Viral titration in various tissues of chickens after avian influenza type A virus inoculation

| tissue | Days post-inoculation | | | | |
|------------|-----------------------|-----|-----|-----|------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Brain | | | | | |
| Cerebral | 2.9 | 1.9 | 2.9 | 2.9 | 2.9* |
| Cerebellum | 2.9 | NT | 3.9 | 3.9 | 1.9 |
| Medulla | 2.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 |
| Bursa | 2.9 | NT | 1.9 | 1.9 | - |
| Liver | 2.9 | NT | 2.9 | 2.9 | 2.9 |
| Kidney | 2.9 | NT | 5.9 | 5.9 | 5.9 |
| Pancrease | 3.9 | NT | 4.9 | 5.9 | 5.9 |
| Trachea | 6.9 | NT | 4.9 | 4.9 | 4.9 |
| Lung | 3.9 | 3.9 | 4.9 | 3.9 | 3.9 |
| Rectum | 3.9 | NT | 2.9 | 4.9 | 3.9 |

* : Viral titer \log_{10} TCID₅₀/ml. NT : not tested.- : Viral titer $< \log_{10}$ 1.4 TCID₅₀/ml.**Table 3** Detection of AI viral antigens by immunoperoxidase staining (IP) in chickens tissues after AI virus inoculation

| Tissue | Days post-inoculation | | | | |
|---------------------|-----------------------|----|----|----|----|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Cerebral | + | + | + | + | + |
| Cerebellum | NT | + | NT | + | NT |
| Optic lobe | + | + | NT | + | + |
| Lung | NT | - | - | + | + |
| Bursa | NT | + | - | + | NT |
| Thymus | + | NT | + | - | NT |
| Spleen | - | NT | + | + | - |
| Heart | - | - | + | NT | NT |
| Duodenum | + | + | + | + | + |
| Kidney | - | + | + | + | NT |
| Subcutaneous tissue | NT | NT | + | NT | NT |
| Nasal cavity | + | NT | NT | NT | - |

+ : AI viral antigens - peroxidase positive.

- : AI viral antigens - peroxidase negative.

NT : not tested.

Table 4 Comparison of virus isolation and indirect immunoperoxidase staining (IP) for detection of AI viral antigens in chickens tissues after AI virus inoculation

| Virus isolation | No. of tissues | | |
|-----------------|----------------|-------------|---|
| | Postive IP | Negative IP | |
| Brain | P* | 8 | 1 |
| | N | 0 | 0 |
| Bursa | P | 4 | 0 |
| | N | 0 | 0 |
| Kidney | P | 8 | 0 |
| | N | 0 | 0 |
| Pancrease | P | 6 | 2 |
| | N | 0 | 0 |
| Trachea | P | 4 | 3 |
| | N | 0 | 0 |
| Lung | P | 5 | 2 |
| | N | 2 | 0 |
| Intestine | P | 6 | 0 |
| | N | 0 | 0 |

*P : AI virus isolation postive from tissues.

N : AI virus isolation negative from tissues.

Table 5 Detection of ND viral antigens by immunoperoxidase staining (IP) in chickens tissues

| Tissue | Days post-inoculation | | | | |
|------------|-----------------------|---|----|----|----|
| | 2 | 4 | 5 | 6 | 9 |
| Cerebral | + | + | NT | + | - |
| Cerebellum | NT | + | NT | + | - |
| Optic lobe | + | - | + | + | - |
| Bursa | - | + | NT | NT | - |
| Thymus | - | + | - | NT | NT |
| Spleen | + | - | NT | NT | - |
| Heart | NT | + | + | NT | - |
| Duodenum | + | + | NT | NT | + |
| Kidney | NT | + | + | NT | + |

+ : ND viral antigens- peroxidase postive.

- : ND viral antigens- peroxidase negative.

NT : not tested.

Table 6 Intensity and background of the tissues under the direct immunoperoxidase staining technique with DAB as chromagen

| Variable | Dilution of peroxidase conjugated rabbit anti-AI IgG | | | |
|------------|--|------|------|-------|
| | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Intensity | +++ ^a | ++ | + | + / - |
| Background | poor ^b | fair | fair | good |

a : Staining intensity graded semiquantitatively as weak to intense. (+ / -)

b : Background, classified as good (light yellow), fair (yellow), or poor (brown), was evaluated on slide stained with Ab diluted 1 : 100.

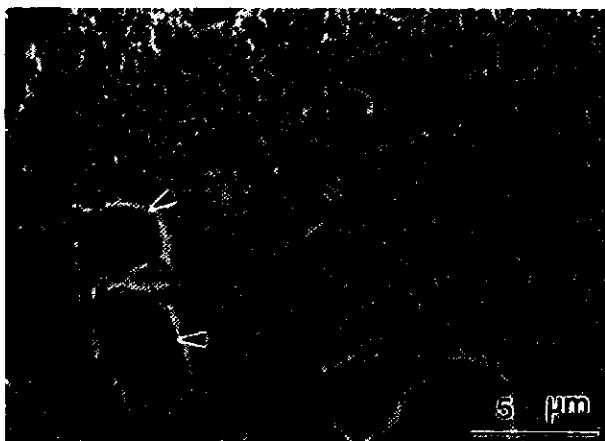


Fig 1 On day 8 post-infection with AE virus, degeneration, absence of chromatin and nucleus, and central chromatolysis (arrow) of the neuron were noticed. H & E stain

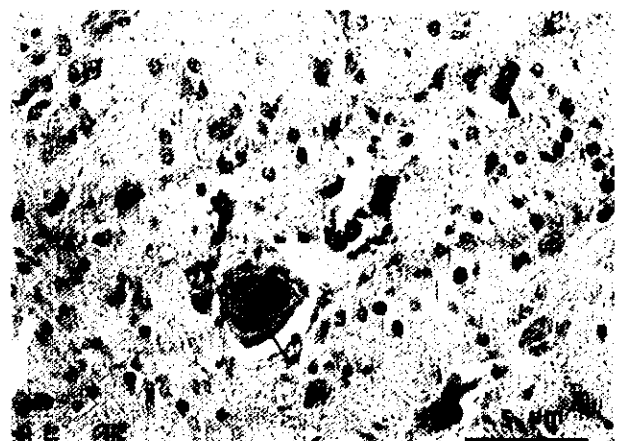


Fig 2 Viral antigen of AE virus appeared in the neuron (long arrow), blue-stained cells (short arrow) contained no viral antigen. direct immunoperoxidase stain

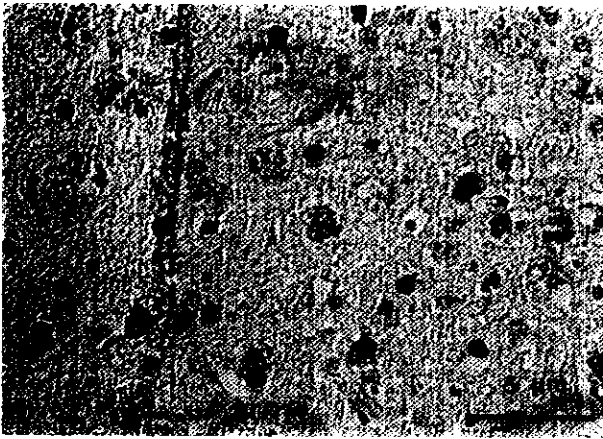


Fig 3 On day 5 post-infection with AI virus. Viral antigen appeared in the nucleus and cytoplasm (arrow) of the cerebellum glia cells. indirect immunoperoxidase stain



Fig 4 On day 5 post-infection with AI virus. Viral antigen appeared in the epithelial cells of the kidney collecting tubules. indirect immunoperoxidase stain



Fig 5 Viral antigen of ND virus appeared in the cerebrum of the experimental infected chick on 4 DPI. direct immunoperoxidase stain

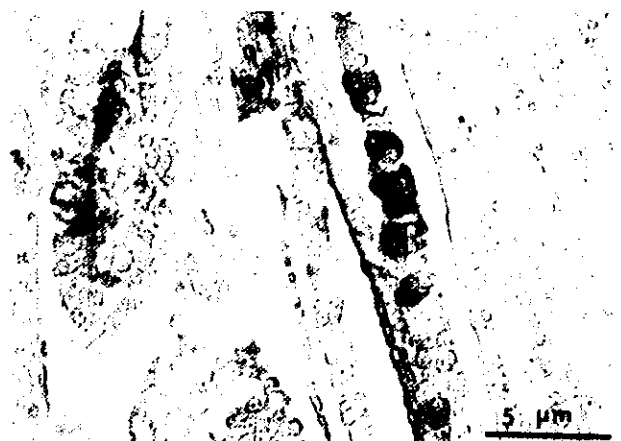


Fig 6 Viral antigen of ND virus appeared in the renal tubular epithelial cells of the experimental infected chick. direct immunoperoxidase stain

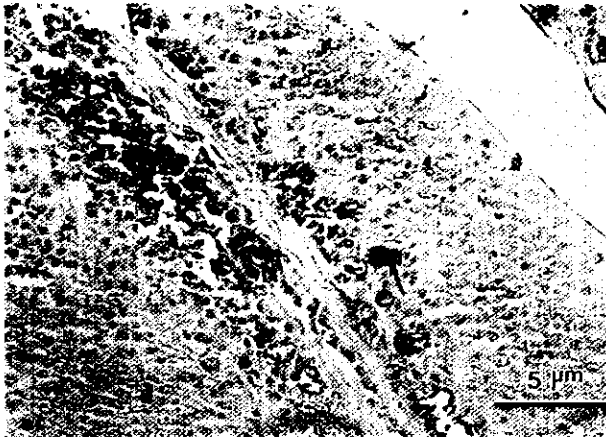


Fig 7 Viral antigen of ND virus appeared in the duodenum epithelial cells of the field case. direct immunoperoxidase stain



Fig 8 No viral antigen was detected in the medulla oblongata of normal chick. (negative control) direct immunoperoxidase stain

討 論

人工感染試驗結果顯示，AI 與 ND 臨床上呼吸及神經症狀極為類似，AI 感染雞其雞冠、眼瞼、腳趾及腳掌呈鬱血及皮下水腫情形；而 ND 感染組則否。ND 感染雞其腸管 Peyer's patch 可見出血及潰瘍灶，AI 感染雞雖可見腺胃粘膜出血，但不見 Peyer's patch 出血及潰瘍等病變，上述相異之處可供區別診斷用，但單靠中樞神經系統之組織病變，不足以鑑別診斷新城雞病及家禽流行性感胃，本免疫過氧化酶染色技術已可供區別診斷之用。

AE 特徵性病變為腦神經細胞呈中心性虎斑小體溶解 (central chromatolysis)，為臨床診斷確診有利之佐證，但遇早期感染病例或腦炎病變不明顯時，本免疫過氧化酶染色技術可早期偵測出病毒抗原，有助於禽病之監控，病變出現部位以小腦及脊髓部兩處最多發，亦為臨床採材所必要。

傳統上，於實驗室中廣泛被用來輔助診斷的螢光抗體法，常受到非特異性螢光干擾，螢光消退及需新鮮病材方能染色等因素限制。自 Taylor and Burns^[17, 18] 等發表免疫過氧化酶技術後，此法不但保有螢光抗體法之優點，亦可改正其缺點，故漸漸取代螢光抗體法之地位。本法適用經福馬林固定、石蠟包埋組織切片，對於任何抗原，包括細胞表面抗原，細胞內抗原及散佈於細胞組織中抗原，為輔助診斷及免疫學研究之最佳工具。近年來此法正急速進步中，目前在國外已成功的應用於許多病毒性疾病之診斷 (Cherrington et al, 1985, Smith et al 1989, Jang & Fletcher 1987, Nagi,

1990) 及已廣泛應用此法測定免疫球蛋白，腫瘤細胞，及特異抗體之鑑定等研究。禽病診斷方面已有應用於傳染性支氣管炎 (IB)、禽痘 (Fowl pox)、雞腎炎 (Avian nephritis)、傳染性喉頭氣管炎 (ILT)、雞里奧病毒 (Avian reovirus)、雞傳染性貧血因子 (CAA)、雞傳染性華氏囊病 (IBD) 等疾病診斷及致病機轉探討等文獻^[11, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21]。

國內費等^[2] 先以福馬林固定雞脾臟細胞內染出免疫球蛋白。劉等^[3] 自鴨病變組織中染出澱粉樣蛋白，李等應用此方法在家禽流行性感胃 A 型病毒之病理學研究，並成功自發病雞之內臟器官染出病毒抗原^[1]，王亦應用間接免疫過氧化酶染色法偵測新城雞病病毒^[20]，嚴等亦應用此法於豬病毒性疾病之診斷^[5, 6]，養豬科學研究所亦以此法進行一系列豬病毒性疾病診斷之研究^[7]。

本省禽病之診斷依據大部份仍仰賴傳統組織形態學，但隨著雞場企業化經營，尤其是水簾式雞舍如雨後春筍般設立，在大量及密集飼養雞隻之環境下，疾病之控制除需倚賴健全之飼養管理外，疾病之監控亦為不可忽視的，故疾病快速診斷系統之建立實有其必要性，尤其是病毒性疾病，病毒之分離曠時廢日，於臨床診斷上常有時效上之遺憾；免疫過氧化酶技術可彌補螢光免疫染色之採材、保存及細胞形態不易辨別等缺點，應用於經福馬林固定、石蠟包埋之組織切片，亦可永久保存且適用於回顧性試驗研究等優點，將其應用於輔助病毒性疾病臨床診斷之用，可彌補病毒分離時效上的不足，本免疫染色法已可供雞中樞神經系統病毒性疾病之常規診斷之用，故往後擬再開發應用於冷凍切片染色，供快速診斷之用。

參考文獻

1. 李淑慧·雞人工感染家禽流行性感冒 A 型病毒之組織病理學研究·台灣大學獸醫學研究所碩士論文·1991.
2. 費昌勇等·經福馬林固定之雞脾臟細胞內免疫球蛋白之免疫染色鑑定法。中央研究院動物研究所集刊 23 卷 2 號, 199-203 頁·1984
3. 費昌勇等·經福馬林固定之牛脾臟細胞內免疫球蛋白之免疫染色法, 中華民國獸醫學會雜誌·12: 37-42. 1986
4. 劉瑞生等·以酵素免疫法測定澱粉樣病之血清及病變組織中的球蛋白, 中華民國獸醫學會雜誌·10: 125-130. 1984
5. 嚴家清、朱光寧、張錦山、劉福陰、謝文逸·豬病毒性疾病快速診斷系統之建立—冷凍切片雙重間接螢光抗體染色法。台糖公司畜產研究 76 / 77 年期研究試驗報告, P163-172。1989
6. 嚴家清、朱光寧、張錦山、劉福陰、謝文逸·應用 Avidin-Biotin- Peroxidase Complex (ABC) 技術於豬假性狂犬病診斷之研究。台糖公司畜產研究所 77 / 78 年期研究試驗報告, P153-160。1989
7. 台灣養豬科學研究所八十年度研究計畫設計書·免疫化學染色法於豬隻疾病診斷之應用。P102-104
8. Chida. K. Immunohistochemical detection of alkaline phosphatase in formalin-fixed and paraffin-embedded rat organs by means of avidin-biotin peroxidase complex method. 70 (5) : 203-207. 1993
9. Colette. J. etc. The detection of turkey rhinotrachitis virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin-biotin-immunoperoxidase method. Avian pathology 401-407. 1990
10. Crruz-coy, J. S. Giambrone. J. J. Hoerr, F. J. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody. Avian disease. 37 (2) : 577-581. 1993
11. Hoop, R. K. & R. L. Reece. The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in studying the pathogenesis of chicken anaemia agent in experimentally infected chickens. Avian pathology 20, 349-355. 1991
12. Guy, J. S, Barnes, H. J, Smith, L. G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. Avian pathology. 21 (1) 77-86. 1992
13. Mcneill Y. F. etc. Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. Avian pathology 20. 125-132. 1991
14. Narita M. etc. An immunohistological study on the nephritis in chicks experimentally produced with avian nephritis virus. Avian Pathology. 19. 497-509. 1990
15. Naqi, S. A. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. Avian Diseases. 34, 893-898. 1990
16. Tang, K. N & Fletcher, O. J. Application of the avidin-biotin- peroxidase (ABC) technique for detecting avian reovirus in chickens. Avian disease. 31, 591-596. 1987
17. Taylor, C. R. etc. The immunohistological detection of intracellular immunoglobulin in formalin-paraffin sections from multiple myeloma and related condition using the immunoperoxidase technique. Clin Exp Immunol. 18. 417-429. 1974
18. Taylor, C. R. Immunoperoxidase techniques. Arch Pathol Lab. Med. 102. 113-121. 1978
19. Tripathy D. N. etc. Immunoperoxidase technique for detection of fowlpox antigen. Avian Dis. 15. 274. 1972
20. Wang, C. H. Application of immunoperoxidase Staining for Newcastle Disease Virus. J Chin Soc Vet Soc 18 (2) : 87-92. 1992
21. Wilson, M. B and Nakane Immunofluorescence and related staining techniques. p215-224. Elsevier / North-Holland Biomedical press. 1978

Application of the immunoperoxidase staining techniques in the diagnosis of avian viral infection of central nervous system

S. H Lee,* M. H Jong, Y. S. Lu, D. F. Lin, M. C. Cheng and S. G Yang

Taiwan Animal Health Research Institute.

SUMMARY The immunoperoxidase staining techniques (direct and indirect) were applied to detect AI (avian influenza), ND (Newcastle disease) and AE (avian encephalomyelitis) virus antigens in formalin fixed, paraffin-embedded section of experimentally and naturally infected chickens. The immunoperoxidase staining technique (IP) was compared with histopathological examination and virus isolation for detection of AI, ND and AE virus in tissues of infected chickens. It is concluded that the IP technique is a good and specific supplementary diagnosis method for viral infection of avian diseases.

Key words: *Immunoperoxidase staining, Newcastle disease, Avian encephalitis, Avian influenza*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.