

應用電顯作為病毒性疾病診斷之研究

黎南榮* 林榮培

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 磷鎢酸負染色法操作簡單快速，解析力強為一良好的病毒快速診斷法。許多無法分離培養的病毒，如兔出血性疾病可利用負染色電顯達到診斷的目的。最近本省的山羊病毒性關結炎腦炎，母羊流行性流產，兔出血性疾病皆因負染色而達到確診目的。有些多形性，且量少之病原如：豬瘟病毒，茨城病毒及牛病毒性下痢病毒，可利用免疫負染色法及戊二醛固定而達到確診之目的。

關鍵詞：負染色，牛病毒性下痢病毒，兔出血性疾病病毒，山羊病毒性關結炎腦炎病毒，披衣菌

緒言

自 1933 年 Ruska 先生發明第一架實用電子顯微鏡後，使科學研究的領域提昇至超顯微的世界⁽¹⁾。可說是廿世紀生物界、醫學界及科學界最重要的發明之一，經過幾十年的研究改進，穿透式電子顯微鏡是研究細微結構之一理想工具⁽²⁾。自 1954 年 Farrant 發明負染色以來，因其操作簡單快速所需樣品體積小，解析力與對比度皆很高，為一有效而快速正確的診斷方法⁽³⁾。本省最近發生豬的流死產，仔豬虛弱，母羊流行流產，羊關結炎腦炎，母豬不明原因下痢，兔出血性疾病皆因負染色法而查到病原，達到確診之目的。有些形態不穩定且顆粒較少之病毒，如披衣病毒屬的牛病毒性下痢病毒及豬瘟病毒，可利用戊二醛固定及免疫負染色法達到確診之目的。

材料與方法

鑄膜：

取 400 mesh 之銅網片經清洗，脫脂後以 amyli acetate 泡置之 1% collodion 覆膜後再於真空蒸著器下加鑄一層炭膜增加其強度。

負染色病材處理：

病材以 PBS 製成 10% 懸浮液以 3,000 rpm 遠心 15 分鐘取上澄液再以 90,000 rpm 之氣動式離心機遠心 10 分鐘取沉渣再以二滴蒸餾水稀釋備用。

負染色：

利用 2% 之磷鎢酸鉀或磷鎢酸鈉與遠心後稀釋之病材 1:1 混合後滴於覆膜之 400 mesh 銅網片以濾紙吸乾後鏡檢。

免疫負染色：

病材以 PBS 製成 10% 乳劑後以 3,000 rpm 遠心 15 分鐘取上澄液與適當濃度抗血清於 4°C 感作一夜經 PBS 清洗 3 次後以負染色法染色。

超薄切片：

病材以 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 行前固定及 1% 四氧化銻後固定，再以 spurr 包埋，薄切鈹鉛雙重染色後鏡檢。

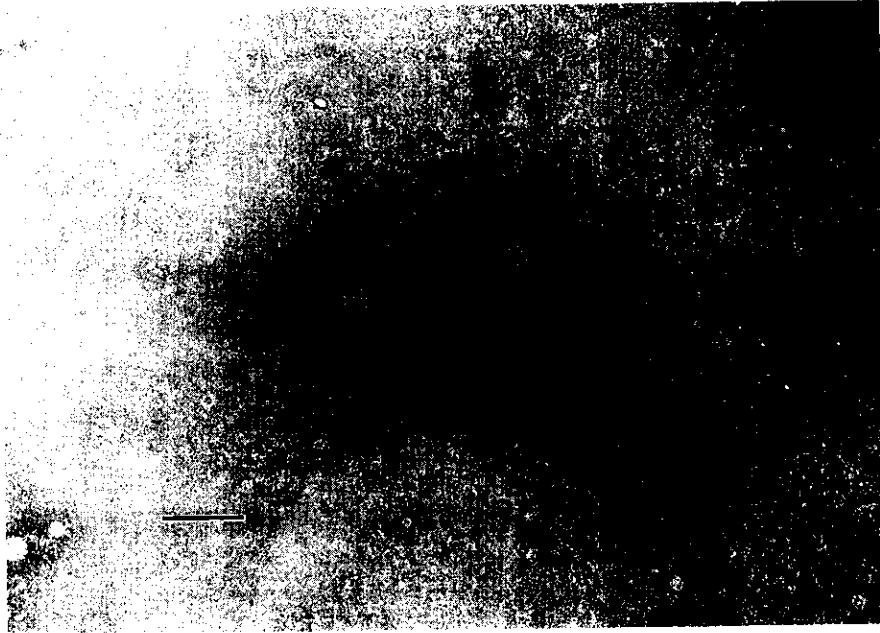
結果

本省南部牧場之山羊陸續發生關結腫大，跛腳取其關結滑液囊增生組織及關結液經初步純化及戊二醛 (glutaraldehyde) 固定後進行負染色，可見到特異性的逆轉錄酶病毒粒子 (圖 1)。

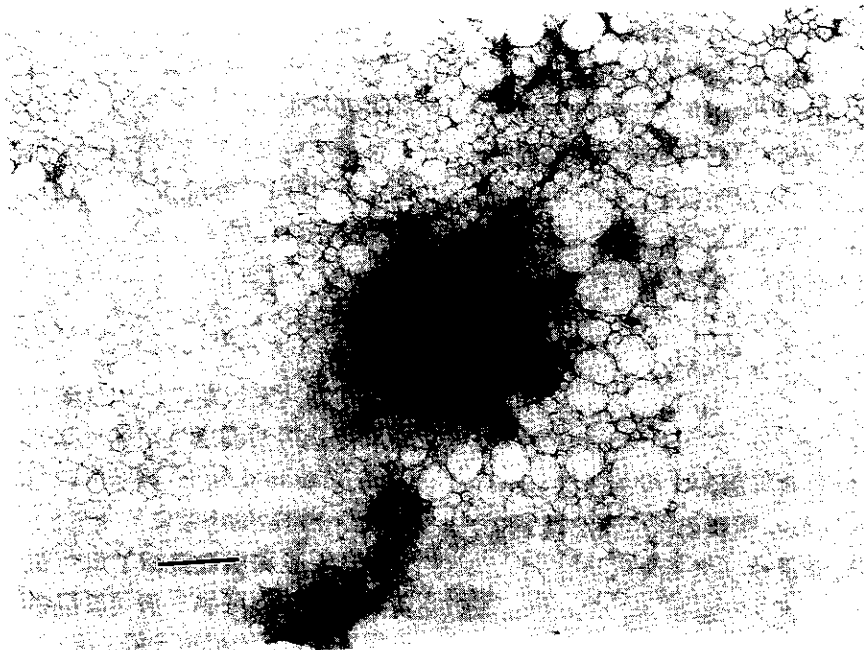
南部某農場發生母羊流死產，取其病材，及公羊之精液接雞胚胎，皆可於接種雞胚胎之卵黃囊內見到具有外套膜的披衣菌 (圖 2)。

自 1994 年 5 月中旬開始嘉南地區養兔場及數個製藥廠，兔子發生發病率及死亡率均接近 100% 的出血性疾病經採取病材以負染色檢查，可於肝、脾、

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所



- 1 山羊病毒性關節炎腦炎病毒 (Caprine arthritis-encephalitis virus)：為逆轉錄酶病毒，病毒經 glutaraldehyde 固定可見病毒周圍有細微突起。
直線代表：100 nm



- 2 披衣菌 (Chlamydia)：於母羊引起流死產之披衣菌，此為原形體 (elementary body)，可明顯看到有三層外膜。
直線代表：200 nm

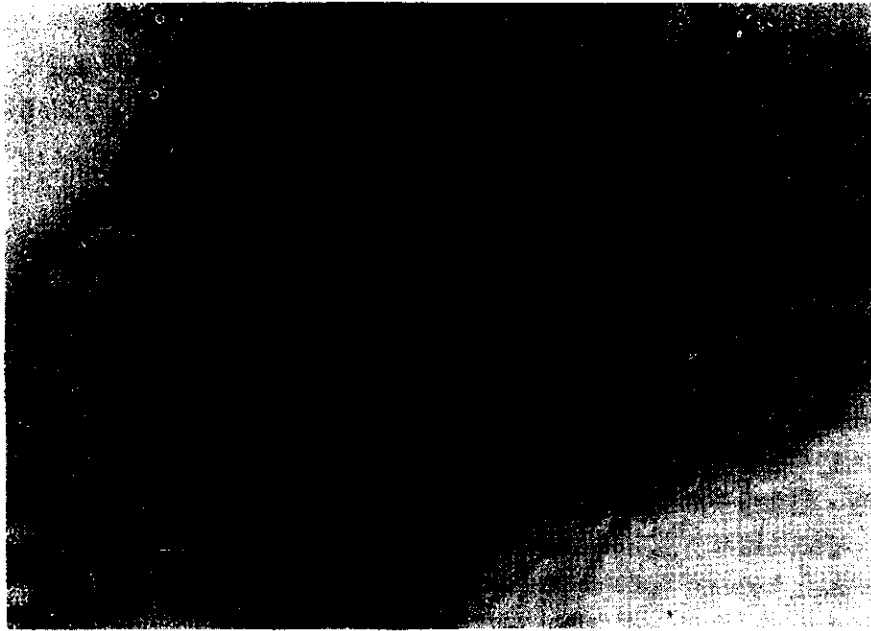


圖 3 兔出血性疾病病毒 (rabbit haemorrhagic disease virus) : 此為杯狀病毒 (calici virus) , 病毒顆粒有明顯的杯狀凹陷 (箭頭)
直線代表 : 100 nm



圖 4 牛病毒性下痢病毒 (bovine viral disease virus) , 此為免疫負染色 , 病毒經過抗體的作用而凝聚在一起 , 可於病毒 (V) 的周圍見到抗體 (箭頭) 。
直線代表 : 100 nm

腎、見到特異性的杯狀病毒(圖3)。披衣病毒一般而言力價不高,形態不穩定極易變形,不易確診,可利用抗體進行免疫負染色及戊二醛固定,使病毒形態固定及特異性的抗體凝聚達到確診的目的(圖4)。

討論

負染色法操作簡單解析力強為一良好的病原檢查方法,以負染色檢查病原時須要有特異形態且病原力價較高才能有好的結果,牛病毒性下痢病毒及豬瘟病毒其力價較低且形態不定可利用抗血清與之作用,以抗體凝聚病毒達到確診之目的。本省中南部養兔場及製藥廠於今年5月開始,所飼養的兔子發生率及死亡率皆接近100%的兔出血症候群,其病原為杯狀病毒,目前兔子杯狀病毒尚無法利用組織培養法培養,組織病理學檢查亦無法達到確診的目的,而至目前為止本省尚無特異性的抗體可供血清學檢查,亦無該病毒的核酸系列供聚合酶鏈反應診斷用,以負染色法及超薄切片檢查特異性的病毒顆粒^(5,6)為達到確診此病的重要方法。

誌謝 本試驗承呂蓮葉小姐精緻細密之電顯材料製備工作始得以完成,謹致萬分之謝意。

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. Bozzola JJ and Russell LD Electron microscopy: Principles and techniques for biologists. Jonis and Bartlett publishers. 1991.
3. England JJ and Reed DE Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viruses of veterinary importance. *cornell Vet.* 70: 125-136. 1980.
4. Glauert AM. Practical methods in electron microscopy. North-Holl and publishing company. 1977.
5. Liu SJ, Xue HP, Pu BQ and Qian NH. A new viral disease in rabbits. *Animal. Husb. Vet. Med.* 16, 253-255. 1984.
6. Park JH, Kida H, Ueda K, Ochiai K, Goryo M and Itakura. Etiology of rabbit haemorrhagic disease spontaneously occurring in Korea. *J. Vet. Med.* B38. 748-754. 1991.

Appilcation of Electron Microscope to the Diagnosis of Virus Infections.

*Nan-Jung LI and Yung-Pei LIN

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

SUMMARY The phosphotungstic acid negative staing technique is quite simple, rapid and high resolutional power, make it to provied a rapid diagnosis of viral infection. Some virus could not be isolated or cultivated by the tissue culture method, rabbit haemorrhagic disease virus,could be identified by the negative staining electron microscopy. In Taiwan we made final diagnosis of caprine arthritis-encephalitis,enzootic abortion of ewe, and rabbit haemorrhagic disease by electron microscopy recently. some pleomorphic or low titer viruses such as hog cholera virus, akabane virus, and bovine viral diarrrhea virus, could be identified by immuno negative staining electron microscopy method.

Key words: *Negative stain, Bovine viral disease virus, Rabbit haemorrhagic disease virus, Caprine arthritis-encephalltis virus, Chlamydia.*

*Corresponding author

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