

應用電顯作為動物病毒性疾病診斷之研究

黎南榮* 林榮培 黃天祥

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 比較磷鎢酸負染色效力，發現鈉鹽之解析力較鉀鹽強，鉀鹽之對比度較鈉鹽強。豬隻接種 ALD 強毒於第 9 天可於耳部之微血管壁見到豬瘟病毒顆粒。經由電顯見到赤羽病毒、中山病、茨城病、魚之立克次體樣病原、豬之疑似繁殖及呼吸道症候群病毒。

關鍵詞：負染色，豬瘟病毒，赤羽病病毒，中山病毒，茨城病

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。可說是廿世紀生物界，醫學界及科學界最重要的一種發明，經過幾十年的研究改進，穿透式電子顯微鏡已成為病毒性疾病診斷之重要工具⁽²⁾，許多病毒如：輪狀病毒，冠狀病毒等皆不易培養，有些病毒形態特異如疱疹病毒、痘病毒、腺病毒等，此時皆可利用操作簡單快速的負染色法診斷^(1,3)，負染色法於 1954 年由 Farrant 首先發明，以原子量較大之重金屬染色液沉積於顆粒外圍造黑白與一般切片相反之影像。此法製作技術簡單，費時甚短，所需樣品體積很少，卻有較高之解像力與對比度，極適合微小顆粒結構如：細菌、病毒等之觀察研究及診斷^(4,5)，萬一海外惡性傳染病侵入時，電顯可能成為一種最有效的快速而正確的診斷方法。

材料與方法

豬瘟接種：以台灣省家畜衛生試驗所檢定分所疫苗檢定用繼代 46 代之 ALD 強毒以 $4.25 \times 10^{4.0}$ PFU/ml 1 ml 肌肉接種 10 週齡小豬後觀察採材、固定、供超薄切片鏡檢。

鑄膜：取 400 mesh 之銅網片經清洗，脫脂後以 amyl 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。

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，薄切鈷鉛雙重染色後鏡檢。

結果

健康小豬接種 ALD 豬瘟強毒後於第 3 至 5 天起開始發病，於第 9 天剖檢時可見典型豬瘟病變經採材固定超薄切片後鏡檢，於耳部皮膚微血管壁之細胞質內見到許多空泡與病毒顆粒，而於血管壁外之組織未見到病毒，此可能與豬瘟造成血管病變有密切關係 (圖 1)。

比較磷鎢酸之負染色能力時發現磷鎢酸鈉之解析力較佳，極適合微細結構之觀察 (圖 2)，而磷鎢酸鉀之對比度顯然較磷鎢酸鈉者為強，但解析力稍差 (圖 3)。負染色之操作簡單，解析力強，即使是最小的小病毒亦可檢測，為一良好的病原檢測方法。最近發生的豬生殖及呼吸道症候群病 (圖 4)、赤羽病 (圖 5)、鱒魚傳染性胰壞死病，桃園地區豬水疱病及組織培養時細胞發育不良 (圖 6)，即以此方法

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

查到病原。

薄切片操作較為繁雜，不太適合常規性的病原檢測，但有些病原以一般的負染色無法順利檢測到時亦可作為輔助診斷法，最近吳郭魚大量死亡，經標本固定、薄切片檢查，發現病原為立克次體及細小核糖核酸病毒（圖7、8）。

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，磷鎢酸鈉可能因其溶解度較佳使其容易進入細小空隙而使解析力增強，可先嚐試使用，如要增加染色效果可再考慮使用分子量較大之磷鎢酸鉀染色，使其對比度增加。豬隻感染豬瘟後可於微血管壁之細胞質內見到許多空泡與病毒顆粒，造成血管細胞結構之破壞，此可能與豬瘟造成全身性血管病變與毒血症有密切的關係。超薄切片為研究致病機轉之良好工具。某些病原如披衣病毒，逆轉錄病毒，負染色時容易變形亦以薄切片較易診斷，一般而言，薄切片因操作繁雜因需時較久，不適用於做為病原診斷之用⁽⁵⁾。

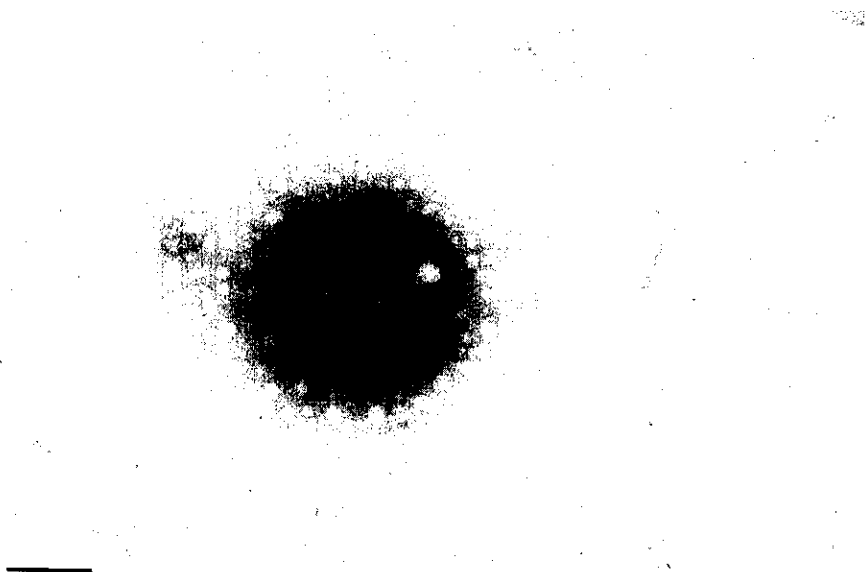
誌謝 本試驗承呂蓮葉小姐精緻細密之電顯材料製備工作始得以完成，致萬分謝意。

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. Doane F W, and Anderson N. Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge university press. 1987.
3. England J J, and Reed D E. Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viruses of veterinary importance. Cornell Vet. 70: 125-136. 1980.
4. Flewett T H, Davies H, Bryden AS and Robertson M J. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. J. Clin. Pathol. 27. 608. 1974.
5. Glauert AM, Practical methods in electron microscopy. North-Holl and publishing company. 1977.



圖 1 ALD 接種第 9 天耳部皮膚之微血管
Vc : Vacuole V : Virus particle
C : Capillary wall R : Erythrocyte
bar : 500 nm



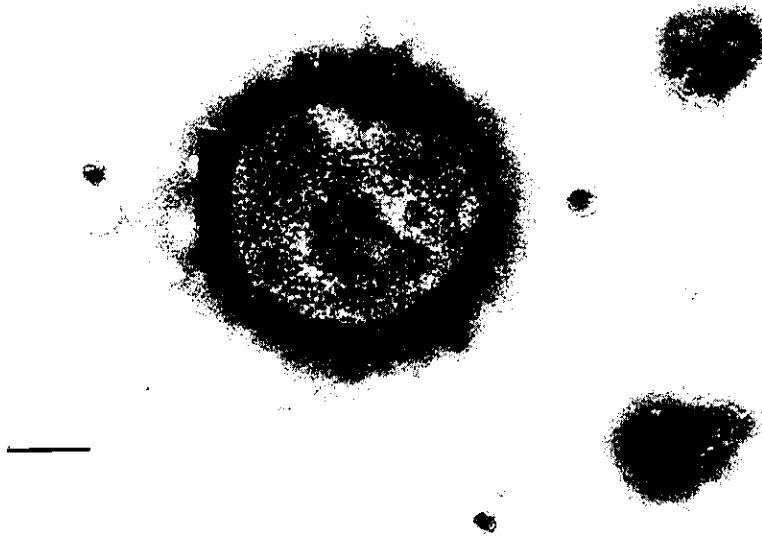


圖 3 雞流行性感胃，磷鎢酸鉀負染色，對比度強，但解析力稍差。
bar : 100 nm

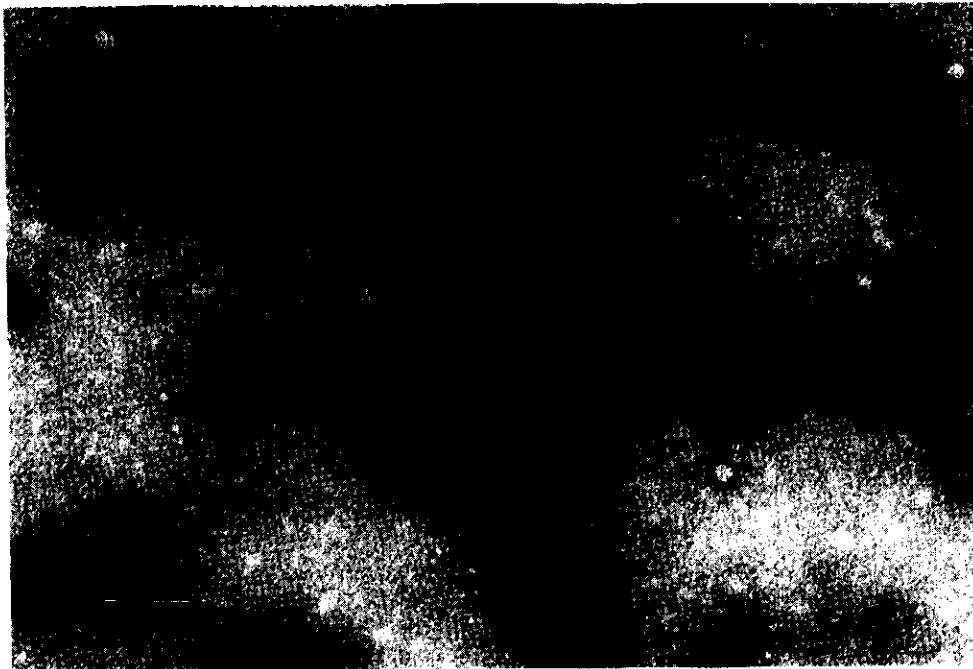


圖 4 豬生殖及呼吸症候群病病毒 V : Virus bar : 100 mn

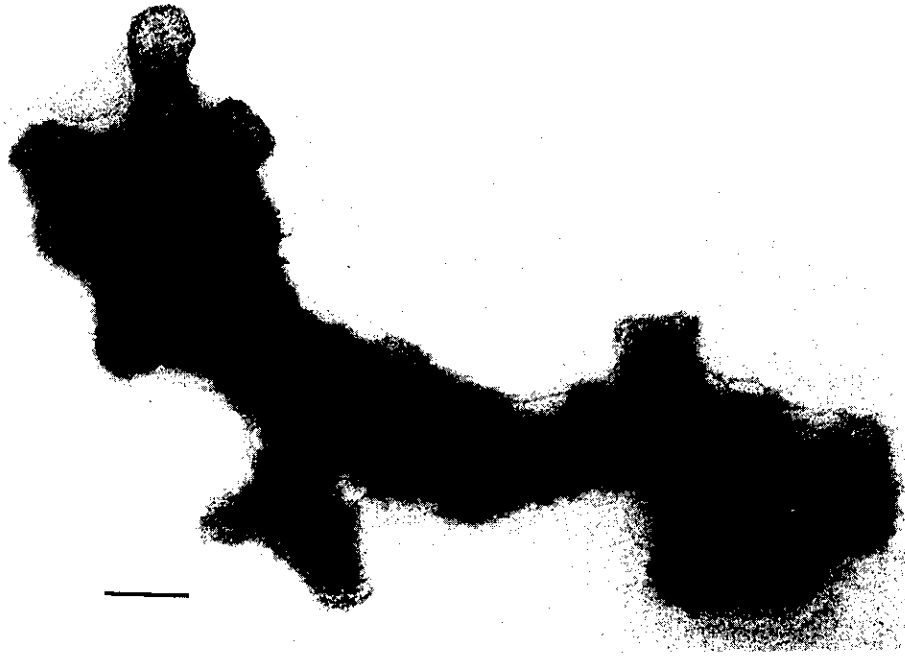


圖 5 赤羽病毒顆粒 bar : 100 nm



圖 6 麥可菌及噬菌體 M : Mycoplasma P : Phage bar : 500 nm



圖 7 吳郭魚 R : Rickettsia-like organism bar : 500 nm



圖 8 吳郭魚 V : Picorna-like Particles barr : 100 nm

Application of Electron Microscope to the Diagnosis of Virus Infections.

* N. J. Li., Y.P. Lin., T.S. Huang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY Phosphotungstic Acid (PTA) negative stain was studied. We found that the sodium salt had better resolution power than that of the potassium salt, while the potassium salt had stronger contrast power than that of the sodium salt. Pig inoculated with Hog cholera virus ALD strain, on the 9th day post-inoculation virus particles were found in the cytoplasm of capillary wall of the ear skin.

Akabane viruses, Chuzan viruses, Ibaraki viruses, Rickettsia-like organism of the Tilapa, and Swine Toga-like Viruses, were confirmed by the electron microscopic examination.

Keywords: *Negative stain, Hog cholera virus, Akabane disease virus, Chuzan disease virus,*