

## 利用免疫電子顯微鏡法診斷獸醫病毒性疾病

黎南榮 林榮培

臨床病毒性材料可藉直接負染色電子顯微鏡法加以診斷，當病毒量太少，顆粒太小或形態相似不易區分時可藉免疫電子顯微鏡法加以確診。鵝小病毒及豬傳染性胃腸炎病毒利用免疫電子顯微鏡法已得到良好的結果。

### 緒 言

爲了有效控制病毒性疾病，遇到臨床病例實驗室需要儘快做診斷，有許多病毒性疾病須要培養的細胞才能進行分離病毒再以實驗室方法加以診斷，此時需時數日，且有許多病毒不易培養，如輪狀病毒及冠狀病毒皆不易培養。負染色電子顯微鏡法藉病毒之大小型態作爲診斷之依據爲一良好的病毒性疾病快速診斷法<sup>1</sup>。但負染色法係靠病毒之型態作爲初步診斷之依據且須高濃度之病毒顆粒（ $10^9$ /ml 以上）。當病毒之形態及大小相似時如 Parvo 及 Picorna 或病毒顆粒太少時則不易診斷，此時可添加特異性之抗體，藉抗體之作用使病毒顆粒凝聚成團再以負染色法觀察，此時除了形態學的依據外再加上免疫學上的理論使診斷更爲確實。

### 材料與方法

(一) 銅網片清洗：取 300mesh 之銅網片以稀鹽酸清洗除去雜質，後以蒸餾水清洗，後再以丙酮除脂備用。

(二) 鑄膜：將洗淨之銅網片先以 Amyl Acetate 泡製之 1% Collodion 製成薄膜覆在銅網片上然後在真空蒸着器下加鑄一層炭膜增加其強度。

(三) 病材處理：病材以 PBS 製成 20% 懸浮液以 10,000rpm 遠心 15 分鐘取上澄液再以 90,000 rpm 之氣動離心機遠心 10 分鐘取沈渣再以 2 滴蒸餾水稀釋備用。

(四) 直接負染色法：以防毛細作用夾子 (Pelco 510—5) 夾取鑄膜之銅網片將處理後之病材以 pH 6.8 之 2% 磷鎢酸鉀 1:1 混合均勻後滴於銅網片上於 1 分鐘內以撕裂之濾紙粗糙邊緣沾吸掉過多之液體陰乾後鏡檢<sup>3,5</sup>。

(五) 免疫負染色法：20% 之 PBS 病材懸浮液以 10,000rpm 處理取上澄液與抗血清於 4°C 感作一夜後以 90,000rpm 之氣動式遠心機遠心 10 分鐘取沈澱以 2% 磷鎢酸鉀依直接負染色法染色。

(六) 電子顯微鏡觀察：染色標本通常係以 Hitachi H—600 電子顯微鏡在加速電壓 75KV 光圈 No. 4 放大倍率 30,000X 下觀察。

### 試驗結果

當鵝小病毒顆粒較少以直接負染色法無法檢出時以抗血清感作後可明顯的看出病毒藉抗體之作用凝聚成團如圖 1 及圖 2，抗血清以 PBS 稀釋 1:200× 至 1:600× 效果最好。豬傳染性胃腸炎病毒經

負染色後可見明顯之冠狀病毒顆粒呈分散狀態分佈如圖3，而經抗體作用之免疫負染色法病毒顆粒因抗原之作用而凝聚成團，且脫落之冠狀突起亦因抗體之作用而凝聚如圖4，使判讀較為容易。

### 討 論

一般而言病毒性疾病診斷須分離病毒，動物接種及血清學診斷，通常需要很長的一般時間及大量人力，且有些病毒不易培養而不易診斷，有時為了防疫的需要，快速診斷為第一優先，尤其是懷疑為海外惡性傳染病時為然。負染色法因操作簡便，解析力強且極為快速依病毒顆粒之大小及結構可很容易做一初步的診斷<sup>1,4</sup>。全部過程僅需30分鐘即可完成為一非常快速而有效的方法。但當病毒濃度不夠，型態相似無法分辨時如小病毒與腸內病毒，豬傳染性胃腸炎病毒及類冠狀病毒時則可以免疫負染色法藉抗體之作用而加以區別<sup>(6)</sup>。但免疫負染色法因抗體之掩蓋，影像較為模糊，且花費之時間較長，手續較繁故僅於特別需要時使用，一般性病毒性材料以直接負染色法較為簡捷。



圖1. 鵝小病毒免疫電子顯微鏡法，抗血清稀釋 200× 箭頭所指為抗體，病毒顆粒因抗體之覆蓋及凝聚而成團，直線代表 100nm。



圖2. 鵝小病毒免疫電子顯微鏡法，抗血清稀釋 600× 箭頭所指為抗體，病毒顆粒因抗體之覆蓋及凝聚而成團，直線代表 100nm。



圖3. 負染色之豬傳染性胃腸炎病毒  
(1) 完整的病毒顆粒。  
(2) 大部份突起脫落之病毒顆粒。  
直線代表100nm。



圖4. 免疫負染色之豬傳染性胃腸炎病毒。  
(1) 凝聚之病毒顆粒。  
(2) 凝聚之脫落突起物。  
直線代表100nm。

## 參考文獻

1. Brandt, C. D., H. W. Kin., W. J. Rodriguez., L. Thomas., R. H. Yolken., J. O. Arrobio., R. H. Parrott and R. M. Chanock (1981). Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rota virus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13 : 976—981.
2. Doane, F. A., N. Anderson, Zbtnew and A. J. Rhodes. (1969). Application of electron microscopy to the diagnosis of virus infections. *Canad. med. Assoc. J.* 100 : 1043—1049.
3. England, J. J. and D. E. Reed. (1980). Negative contrast electron microscopy techniques for diagnosis of virus of veterinary importance *cornell Vet.* 70 : 125—136.
4. Gibbs, E. P. J., C. J. Smale., and C. A. Voyle (1980). Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus disease of veterinary importanec. *Vet. Rec.* 106 : 451—458.
5. Hilary, J. W. and F. G. Rodgers (1980). Detection of virus particles by electron microscopy with polyacrylamid hydrogel *J. Clin. pathol.* 33 : 481—487.
6. Mc Feran, J. B., McNulty, M. S. and Aimlt, W. L. C. (1978) Diagnosis of avian viral disease by electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 39 : 505—508.

## Immunolectron Microscopic Techniques for Diagnosis of Virus of Veterinary Importance

N. J. Li, and Y. P. Lin

Clinical viral samples can be examined by the direct negative staining electron microscopy. However, many viruses, being small in quantity or size or having no or little characteristic morphology, are difficult to be identified by means of the direct negative staining technique.

Immunolectron microscopy has overcome some of these problems and can facilitate the identification of a virus that is difficult to isolate. The identification of the goose parvo virus and the swine transmissible gastroenteritis virus obtains good results from immunolectron microscopy.

