

猪赤痢病理診斷之研究

李 正 雄

(臺灣省家畜衛生試驗所)

摘 要

應用 Warthin—Starry 方法理想清晰染出猪赤痢猪結腸黏膜腺腔，上皮組織表面及組織細胞中之螺旋菌。Levaditi—Manovelian 法染色結果相同，唯操作較麻煩費時。Basic fuchsin 及 Victoria blue 4—R 亦可染出黏膜腺腔及上皮表面之螺旋菌，唯無法分辨染出組織細胞內之螺旋菌。

猪赤痢猪結腸塗抹片或糞便塗抹片，以 Basic fuchsin 及 carbol fuchsin 染色，可理想穩定染出螺旋菌。Fontanna—Hage 鍍銀法染出螺旋菌效果良好，唯過程稍複雜，較不穩定，需陽性對照。Victoria blue 染色和 Basic fuchsin 比較，前者染色較差。

緒 言

猪赤痢臨床症狀及病理變化前曾用為猪赤痢疾病診斷之依據。最近螺旋菌被認為是猪赤痢的病原菌^(1,2,3,4,7,8)。螺旋菌存在猪赤痢病猪的結腸粘膜炎及糞便中。此種存在之螺旋菌利用暗視野及位相差顯微鏡可檢出。然而糞便乾燥塗抹片及結腸組織切片仍待可靠染色方法，以檢出螺旋菌，以為本病正確的診斷。

塗抹片上之螺旋菌，曾應用 carbol fuchsin, Victoria blue 4—R, Giemsa 等染色方法以檢查。而組織切片中亦曾應用鍍銀法, Goodpasture Gram 染色法，及 Victoria blue 4—R，以染色組織中之螺旋菌。本試驗目的為比較各種染色方法並確立可靠有效染色方法以染色塗抹片及組織上之螺旋菌，以輔助正確診斷猪赤痢。

材 料 與 方 法

A 結腸組織切片病理診斷

1. Warthin—Starry 方法及 Levaditi—Manovelian 方法。

感染猪結腸片段固定於10%中性緩衝福馬林溶液，經酒精脫水，二甲苯透明，石蠟滲透及包埋後，組織薄切6 μ 厚度，依照 Warthin—Starry 染色螺旋菌之步驟實施⁵⁾。至於 Levaditi—Manovelian 法為將感染猪赤痢猪結腸片段固定 10% 中性福馬林溶液，切成 1mm 厚後，依 Levaditi—Manovelian 染色螺旋菌方法步驟實施染色⁵⁾。同時應用對照猪赤痢感染結腸組織切片，實施 Hematoxylin 及 Eosin 染色。

2. Basic fuchsin 染色及 Victoria blue 4—R 染色。

感染猪赤痢結腸，固定10%中性福馬林溶液，經酒精脫水，二甲苯透明，石蠟滲透包埋過程，組織薄切6 μ 如厚度，經脫蠟，脫水，空氣乾燥，滴加 0.5% 碳酸鈉作用 1 分鐘，再加入 0.3% Basic fuchsin Solution (配法：Basic fuchsin 粉末 0.3gm + 95% 酒精 10ml + 蒸餾水 90ml) 作

用 10 分鐘。以自來水水洗，立刻實施封埋或經乾燥，酒精脫水，二甲苯透明後封埋。Victoria blue 4—R 染色依報告實施⁶⁾。此 Victoria blue 4—R 染色為以 0.5% Victoria blue 4—R 溶液染色 3 分，水洗後，再以 0.05% 硫酸作用 15 秒，其他過程和 Basic fuchsin 染色方法同。

3. MacCallum—Goodpasture Gram Stain 依⁵⁾所述實施。

B. 結腸塗抹或糞便塗抹病理診斷

1. Basic fuchsin 簡單染色方法。

感染可疑糞便或結腸塗抹片固定 1% 福馬林 1 分鐘，棄掉固定液，滴加 5% 碳酸鈉，蓋滿玻片作用 1 分鐘，棄掉 5% 碳酸鈉，滴加 8~10 滴 0.3% Basic fuchsin 溶液（配法同前述）作用 3~5 分。以自來水洗，乾燥，封埋，鏡檢。

2. Fontanna—Hage 鍍銀法。

糞便或結腸黏膜塗抹片，自然乾燥，以（40% 福馬林溶液 20cc + 冰醋酸 1cc + 蒸餾水 100cc）之固定液固定 1 分，蒸餾水沖洗。再以（酚太 Phenol 1 克 + 單寧酸 Jannic acid 5 克 + 蒸餾水 100cc）蓋滿，玻片底下以火焰加熱，直至玻片溶液開始有蒸汽出現時，即移開火焰，靜置 30 秒。以自來水數次換洗，每次 30 秒。經 0.25% 鉍硝酸銀蓋滿（配法：1% 硝酸銀，應用時 1:3 稀釋，再加數滴強氫氧化鉍）並以火焰加熱，蒸汽出現，即離開火焰靜置 30 秒。塗抹片開始出現黃褐色時，立刻加 1 滴氫氧化鉍，加後應該出現褐色泡沫。經蒸餾水水洗、乾燥、封埋、鏡檢。

3. Victoria blue 4—R 染色

塗抹片以 0.5% Victoria blue 4—R 染色 3 分，以 0.05% 硫酸作用 15 秒。經水洗、乾燥、鏡檢。

結果與討論

Warthin—Starry 及 Levaditi—Manovelian 方法染色後，可發現波狀的螺旋菌清楚存在於結腸黏膜腺腔、黏膜表面組織碎片及結腸組織細胞，其染出螺旋菌呈黑色，而結腸組織背景呈淡黃至黃褐色。染色結果如圖 1, 2 所示。豬赤痢結腸組織以對照 Hematoxylin 及 Easin 染色結果，無法染出螺旋菌。

利用 Basic fuchsin 和 Victoria blue 4—R 染色結腸組織結果，於上皮表面及黏膜腺腔可染出螺旋菌，Basii fuchsiu 染出螺旋菌如圖 3, 4 所示。Basii fuchsin 染色結果較 Victoria blue 4—R 深，然而此二種染色皆無法染出組織細胞中之螺旋菌。利用 Warthin—Starry 方法較 Basic fuchsin 及 Victoria blue 4—R 理想，因為 Warthin—Starry 方法於黏膜表面出現 fibrino—necrotic 組織碎片，仍可清晰分辨出螺旋菌。此種 fibrino—necrotic 組織常常於豬赤痢末期的結腸發現到，於此時期，黏膜螺旋菌數目亦較少，一般實驗室送檢豬隻常發病一段時間方送檢。利用 Levaditi—Manovelian 染色，雖亦能分辨出組織碎片及組織細胞之螺旋菌。然而此方法染色組織塊，實施過程較費時，其脫水，透明，滲透過程和一般病理實驗室切片實際操作過程不同，染色效果和 Warthin—Starry 染色結果相同。利用 MacCallum—Goodpasture Gram 染色螺旋菌效果不好，且染色結果不穩定。

染出螺旋菌直徑大約 $0.3\mu\text{m}$ ，長度 $10\mu\text{m}$ 和其他研究者發表一致。當以電子顯微鏡檢查結腸組織薄切片時，此種螺旋菌見到薄外膜，含 axial fibrils 及具有 protoplasmic cylinder 構造。這些螺旋菌形狀被認為是豬赤痢可能之病原。於有些組織切片上，這些螺旋菌數目衆多，於黏膜腺腔中形成如網狀集堆，亦分佈黏膜上皮表面及組織中，此種螺旋菌染色時，很容易和 fibrin 區別出來。

利用 basic fuchsin 染色糞便或結腸塗抹片，染出螺旋菌呈“S”狀或 2~3 轉之螺旋菌。此種螺旋菌染呈紅色如圖 5 所示。此 Basic fuchsin 染色方法可確實可靠染出塗抹片上之螺旋菌，其固定

液，碳酸鈉，染色液相當穩定，染色結果理想。如以 0.5gm carbol fuchsin 代替 0.3gm basic fuchsin，其他成分步驟相同，染出結果亦同。以 Fontanna—Hage 染色，染出塗抹片上之螺旋菌呈黑褐色，背景呈現黃色，此方法染出螺旋菌清晰，和別細菌背景極易區別，其染色結果如圖 6 所示。此種染色方法稍複雜，染色時需要陽性塗抹片當對照。以 0.5% Victoria blue 4—R 染色，亦染出螺旋菌呈藍色，唯此染色效果和 Basic fuchsin 染色結果比較，Victoria blue 4—R 染色效果稍差。

參 考 文 獻

1. Akkerman, J. P. W. M., and Pomper, W. 1973 : Etiology and Diagnosis of Swine Dysentery (Doyle) . Neth. J. Vets. Sci., 98 : 949—654.
2. Glock, R. D., and Harris, D. L. 1972 : Swine Dysentery II. Characterization of Lesions in Pigs Inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in Pure and Mixed Culture. Vet. Med. Small Anim. Clin., 67 : 65—68.
3. Hamdy, A. H., and Glenn, M. W. 1974 : Transmission of Swine Dysentery with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli*. Am. J. Vet. Res., 791—797.
4. Harris, D. L., Glock, R. D., Christensen, C. R., and Kinyon, Joann M. 1972 : Swine Dysentery 1. Inoculation of Pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and Reproduction of the Disease. Vet. Med. Small Anim. Clin., 67 : 61—64.
5. Lee, G. Luna : Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3 rd Edition.
6. Olson, L. D. 1973 : Staining of Histologic Sections of Colon with Victoria Blue 4—R as an aid in the Diagnosis of Swine Dysentery. Am. J. Vet. Res., 34 : 853—854.
7. Olujic, M., et. al. 1973 : Investigation of Swine Dysentery. 1. Isolation and Determination of Spirochete (*Treponema hyodysenteriae*) in Affected Swine. Veter. Glasnik 4 : 241—245.
8. Taylor, D. J., and Alexander, T. J. L. 1971 : The Production of Dysentery in Swine by Feeding Cultures Containing a Spirochete. Brit. Vet. J., 127. 58—61.

Detection of Spirochetes in Histologic Sections and Smears of Colon as an Aid in the Diagnosis of Swine Dysentery

Cheng. H. Lee

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

When stained with the Warthin—Starry method, spirochetes which have been associated with swine dysentery were observed clearly and consistently both in the lumen of the mucosal gland and in tissue debris on the mucosal surface of histologic sections of the colon in swine with a hemorrhagic diarrhea and infected with swine dysentery. When stained with Levaditi—Manovelian method, the same results as with the Warthin—Starry method were obtained. When stained with basic fuchsin or victoria blue stain, spirochetes were observed clearly and consistently on the epithelial surface and in the lumen of the mucosal glands of histologic sections of the colon, but not in the tissue. Spirochetes stained brighter with basic fuchsin. Spirochetes were faintly detected by the MacCallum—Goodpasture gram method.

The spirochetes in smears were easy to identify by the basic fuchsin stain, carbol fuchsin stain, and victoria blue stain, but the staining effect of victoria blue was weaker. Good staining results, where the spirochetes stained black with a yellow background, was obtained with the Fontanna—Hage silver method.



圖 1. 感染猪赤痢猪結腸黏膜腺腔中之螺旋菌。
Warthin—Starry 染色
Fig. 1. Spirochetes in the lumen of mucosal gland of infected colon. Warthin—Starry Method $\times 1,000$.



圖 2. 感染猪赤痢猪結腸上皮表面之螺旋菌。
Warthin—Starry 染色 $\times 1,000$ 。
Fig. 2. Spirochetes in the surface of mucosal epithelium of infected colon. Warthin—Starry Method $\times 1,000$.



圖 3. 感染猪赤痢猪結腸黏膜腺腔中之螺旋菌。
Basic Fuchsin 染色 $\times 1,000$ 。
Fig. 3. Spirochetes in the lumen of mucosal gland of infected colon. Basic Fuchsin Staining $\times 1,000$.

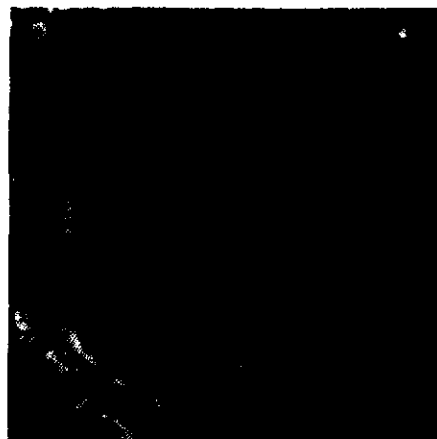


圖 4. 感染猪赤痢猪結腸上皮表面之螺旋菌。
Basic Fuchsin 染色 $\times 1,000$ 。
Fig. 4. Spirochetes in the surface of mucosal epithelium of infected colon. Basic Fuchsin Staining $\times 1,000$.

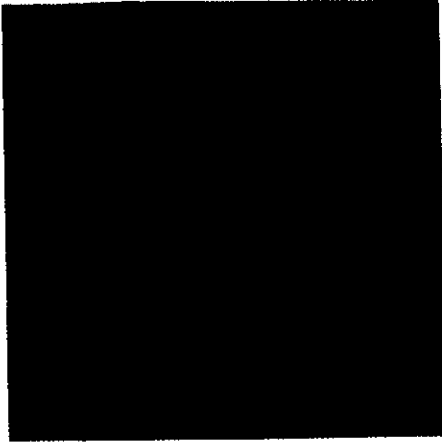


圖 5. 感染猪赤痢猪結腸黏膜塗抹片上之螺旋菌。
Basic Fuchsin 染色×1,000。
Fig. 5. Spirochetes from the smear of infected
colon. Basic Fuchsin Staining×1,000.

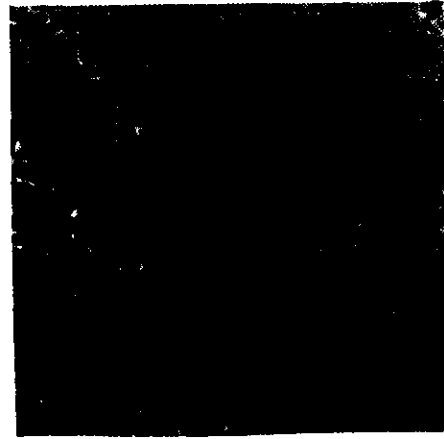


圖 6. 感染猪赤痢猪結腸黏膜塗抹片上之螺旋
菌 Fontanna—Hage 鍍銀法×1,000。
Fig. 6. Spirochetes from the smear
of infected colon. Fontanna—Hage
Silver Staining×1,000.