

用间接免疫荧光染色法检测鸭病毒性肠炎病毒在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律

程安春^{1,2}, 韩晓英^{1,3}, 汪铭书^{1,2*}, 袁桂萍^{1,2}, 徐超^{1,2}, 廖永洪¹

(1. 四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心, 雅安 625014;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014; 3. 四川农业大学郫县水产学院, 郫县 611700)

摘要: 用鸭病毒性肠炎病毒(DEV)CHv 强毒株感染成年鸭复制鸭病毒性肠炎急性病例, 分别于接种后不同时间, 取心、肝、脾、肺、肾、胸腺、食道、十二指肠、胰腺、法氏囊和脑组织, 制作切片, 应用间接免疫荧光染色法(IFA)检测 DEV 在鸭体内的侵染过程和分布规律。结果显示: 感染后 4 h 可在脾脏、胸腺和法氏囊中检测到 DEV 抗原; 感染后 6 h 可在肝脏、食道、十二指肠、直肠及肺脏检测到 DEV 抗原; IFA 对各组织器官中 DEV 的平均检出率为肝脏 46/50、脾脏 48/50、肺脏 46/50、肾脏 0/50、肠道 46/50、法氏囊 46/50、胸腺 47/50、胰腺 0/50、大脑 0/50、食道 44/50、心脏 0/50。研究表明: 在急性病例中, 脾脏、法氏囊、胸腺、食道、肠道、肝脏和肺脏为 DEV 的主要靶器官; 接种后, 病毒首先在脾脏、胸腺、法氏囊中出现, 然后病毒迅速传播到肝脏、消化道和肺脏中; IFA 检测石蜡切片中 DEV 的方法具有直观、特异性强的优点, 是对 DEV 进行检测和抗原定位的较好方法。

关键词: 间接免疫荧光染色; 鸭病毒性肠炎病毒; 检测; 分布

中图分类号: S852.659.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)09-0942-05

Research on the Invading Process and Distribution of Duck Enteritis Virus in Artificially Infected Ducks by Indirect Immuno-Fluorescent Staining Method

CHENG An-chun^{1,2}, HAN Xiao-ying^{1,3}, WANG Ming-shu^{1,2*}, YUAN Gui-ping^{1,2},
XU Chao^{1,2}, LIAO Yong-hong¹

(1. Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine,

Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal
Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, China;

3. College of Aquiculture Science, Sichuan Agricultural University, Pixian 611700, China)

Abstract: Fifty adult ducks were inoculated with a virulence duck enteritis virus (DEV, strain CHv), and acute cases of duck viral enteritis (DVE) were duplicated. Tissue samples from heart, liver, spleen, lung, kidney, thymus, duodenum, bursa of Fabricius, brain, esophagus and the pancreas were collected after inoculation and paraffin slices of these samples were prepared. The method of indirect immuno-fluorescent staining (IFA) was applied to investigate the invading process and distribution of DEV. The results showed that DEV antigen can be detected in the spleen, thymus and bursa of Fabricius 4 hours after infection and in the liver, esophagus, duodenum, rectum and the lung 6 hours after infection. The positive rate of viral antigen in different tissues detected by IFA was 46/50 in the liver, 48/50 in the spleen, 46/50 in the lung, 0/50 in

收稿日期: 2006-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(3047129); 教育部"新世纪优秀人才支持计划"项目(NCET-04-0906); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(706050); 国家农业科技成果转化资金(2006GB2F00249); 四川省重点建设学科项目(SZD0418)

作者简介: 程安春(1965-), 男, 贵州长顺人, 博士, 教授, 主要从事水禽传染病致病机理、免疫及分子生物学的研究。前二位作者对本文贡献相同, 为并列第一作者

* 通讯作者: 汪铭书, Tel/Fax: 0835-2885774, E-mail: mshwang@163.com

the kidney, 46/50 in the intestine, 46/50 in the bursa of Fabricius, 47/50 in the thymus, 0/50 in the pancreas, 0/50 in the brain, 44/50 in the esophagus and 0/50 in the heart. The research suggested that the spleen, bursa of Fabricius, thymus, esophagus, intestine, liver and the lung are the main target organs of DEV in acute DVE cases. After infection, DEV appears in the spleen, the thymus and bursa of Fabricius first, then spreads to the liver, alimentary canal and the lung quickly. IFA is a sensitive and specific method in detecting DEV antigen in paraffin slices and it is a good method for diagnosis and antigen location of DEV.

Key words: indirect immuno-fluorescent staining; duck enteritis virus; detection; distribution

鸭病毒性肠炎(Duck viral enteritis, DVE),又名鸭瘟(Duck plague, DP),是由鸭病毒性肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV)引起鸭、鹅和天鹅的一种急性败血性传染病。该病为一种全身性感染的传染病,其特征为体温升高,两腿麻痹、下痢、流泪和部分鸭头颈肿大,血管损伤,组织出血,消化道黏膜特定部位有疹状损害,淋巴器官受损以及实质器官的退行性变化,发病率和死亡率甚高,是养鸭业的一大危害^[1,2]。为了更好地对 DVE 进行有效的防治,有必要发展良好的病原检测和定位手段,并对其致病机理进行深入研究。病理学研究表明,DEV 侵入鸭体后,主要侵害上皮细胞和淋巴细胞^[3~8]。目前检测 DEV 抗原的方法较多,但未见用免疫荧光染色(IFA)和石蜡切片技术研究 DEV 在感染鸭体内的侵染过程和分布的报道,本研究以 IFA 检测了皮下接种 DEV 强毒感染成年鸭后,DEV 在鸭体内的侵染过程和分布情况。

1 材料与方法

1.1 病毒、实验动物和对照标本

DEV 强毒 CHv 株,对 2~3 月龄鸭最小致死量(MLD)为 10^{-8} /mL,由笔者所在实验室分离、鉴定和保存;健康 2 月龄樱桃谷鸭,源于无 DVE 感染史地区,且未免疫接种过 DVE,经 ELISA 检测 DEV 血清抗体阴性;鸭病毒性肝炎病毒 QL 株、血清 1 型鸭疫里默氏杆菌病、鸭多杀性巴氏杆菌(5:A)、鸭沙门氏菌(3,10:e,h:1,6)和鸭大肠杆菌(O128)人工感染死亡鸭肝脏石蜡包埋标本,由四川农业大学动物科技学院禽病防治研究中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

FITC-羊抗兔 IgG,购自华美生物工程公司;兔抗 DEV IgG,其琼扩效价为 1:64,蛋白浓度为 1 mg/mL,工作浓度为 1:500 稀释,由本实验室自制;粘片剂 APES,购自成都天泰生物有限公司;

RM2128 轮转式切片机(leica 公司);一次性刀片(FEATHER R35 型 STAINLEAA JAPAN);Eclipse E400 型荧光显微镜(Nickon 公司)。

1.3 鸭病毒性肠炎的人工感染及样品的采集

52 只鸭随机分为 2 组:正常对照组 2 只,皮下接种生理盐水;人工感染 DEV 组 50 只,皮下接种 DEV-CHv 株, 10^4 MLD/只。接种后 2、4、6、12 和 24 h 剖杀取样,以后每隔 24 h 取样,2 只/次,直至有鸭发生死亡时停止剖杀而采集死亡鸭的组织器官,并观察记录发病及死亡情况。采集的样品包括心肌、肝脏、肾脏、肺脏、脾脏、食道、肠道、胸腺、法氏囊、胰腺和大脑。

1.4 切片的制作

将所取样品按常规方法固定、修块、包埋,将蜡块切成 4 μ m 厚切片,按常规方法脱蜡入水。

1.5 间接免疫荧光染色检测

1.5.1 步骤 石蜡切片以 pH6.0 的柠檬酸缓冲液为微波修复液,微波修复 10 min,胰酶修复 20 min;PBS 液洗涤 3 次 \times 5 min;10% 小牛血清室温封闭 30 min;加入 1:25 一抗(兔抗 DEV IgG),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;用 PBS 液洗 3 次 \times 5 min;加入二抗(FITC-羊抗兔 IgG)37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min;PBS 液洗 3 次 \times 5 min;用 50% 甘油缓冲液封片。

1.5.2 特异性试验 ①标本自发荧光对照:标本不加一抗和二抗,只加 PBS,缓冲甘油封片;②荧光抗体对照:标本不加一抗,只加荧光抗体(二抗)染色;③阴性和阳性抗原对照:无已知抗原的阴性标本(正常对照鸭肝脏,PCR 检测 DEV 阴性)和有已知抗原的阳性标本(发病死亡鸭肝脏,PCR 检测 DEV 阳性)分别与 DEV 特异性的免疫血清作用,再用荧光抗体染色;④阴性和阳性血清对照:将已知抗原分别与阴性血清(正常兔血清)和阳性血清(兔抗 DEV 血清,琼扩效价为 1:128)作用,再用荧光抗体染色;⑤替代试验:用 PBS 液替代一抗进行染色;⑥吸

收试验:用抗原与制备的兔抗 IgG 抗体等量混合, 37℃ 孵育 4 h, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清代替兔抗 DEV IgG 进行染色; ⑦对其他病原人工感染致死鸭肝组织的检测: 对鸭病毒性肝炎病毒 QL 株、血清 1 型鸭疫里默氏杆菌、鸭源多杀性巴氏杆菌 (5: A)、鸭沙门氏菌 (3, 10; e, h; 1, 6) 和鸭大肠杆菌 (O128) 人工感染死亡鸭肝脏石蜡包埋标本进行间接免疫荧光染色。

1.5.3 结果判定 用 Eclipse E400 型荧光显微镜观察、照相, 按照光学显微镜视野下观察到的特定细胞经染色后黄绿色的有无、数量及深浅来判定。判断标准: 无或可见微弱荧光为“—”; 视野中有 1~20 个细胞可见明确的荧光为“+”; 视野中有 21~50 个细胞可见明确的荧光为“++”; 视野中有 51 个以上细胞可见明确的荧光为“+++”。凡出现“+”以上者判为阳性。

1.6 DEV 在人工感染鸭体内的侵染和分布规律

按 1.5 的方法对 1.3 采集人工感染 DEV 样品的组织切片进行间接免疫荧光染色检测, 根据各组织中检测到 DEV 阳性的时间判定 DEV 在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律。

2 结果与分析

2.1 间接免疫荧光染色检测 DEV 的特异性

①标本自发荧光对照: 无荧光; ②荧光抗体对照: 无荧光; ③阴性和阳性抗原对照: 阴性标本无荧光, 阳性标本出现特异的明亮荧光; ④阴性和阳性血清对照: 阴性血清无荧光, 阳性血清出现特异的明亮荧光; ⑤替代试验: 无荧光; ⑥吸收试验: 无荧光; ⑦对其他病原人工感染致死鸭的肝组织检测: 均无荧光。表明所建立的间接免疫荧光染色检测 DEV 具有较好的特异性。

2.2 间接免疫荧光染色对人工感染 DEV 死亡鸭各组织器官的检测

以间接免疫荧光染色法对人工感染 DEV 后不同时间和发病死亡鸭的各组织器官进行检测, 结果感染后 4 h 可在脾脏、胸腺和法氏囊中检测到 DEV 抗原; 感染后 6 h 可在肝脏、肠道 (十二指肠和直肠) 及肺脏中检测到 DEV 抗原。感染后 12 h 可在食道中检测到 DEV 抗原, 心脏、肾脏、胰腺和大脑在整个试验过程中均未检测到病毒抗原 (见表 1 和图 1)。

表 1 间接免疫荧光染色对人工感染鸭各组织器官中 DEV 的检测结果

Table 1 The detection result of DEV antigen in each organ of artificially infected ducks by IFA

组织 Tissues	感染后时间 Time post inoculation							死亡鸭 Dead ducks	总计 Total
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h		
心脏 Heart	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/36)	0/50
肝脏 Liver	—(0/2)	—(0/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (36/36)	46/50
脾脏 Spleen	—(0/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(36/36)	48/50
肺脏 Lung	—(0/2)	—(0/2)	+(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(2/2)	++(36/36)	46/50
肾脏 Kidney	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/36)	0/50
肠道 Intestine	—(0/2)	—(0/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (36/36)	46/50
法氏囊 Bursa of Fabricius	—(0/2)	+(1/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (36/36)	46/50
胸腺 Thymus	—(0/2)	+(1/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (36/36)	47/50
胰腺 Pancreas	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/36)	0/50
大脑 Cerebrum	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	—(0/36)	0/50
食道 Esophagus	—(0/2)	—(0/2)	—(0/2)	++(2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (36/36)	44/50

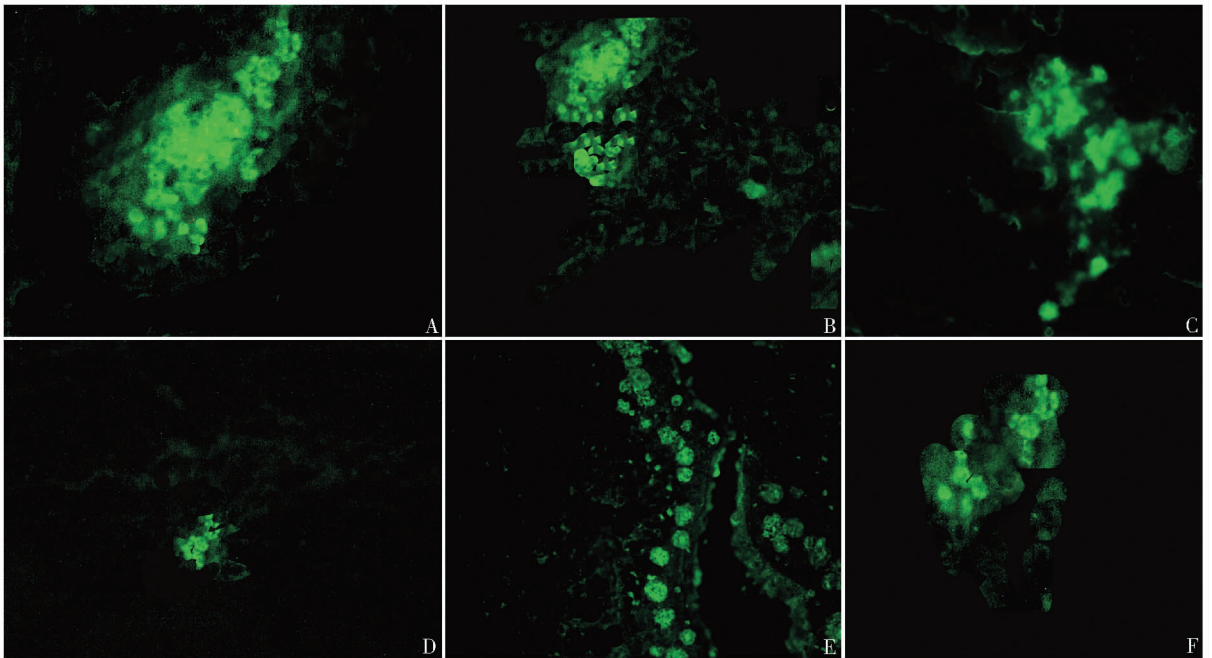
+, 阳性; —, 阴性。表中数字分母为检测的样品数, 分子为检测的阳性样品数

+, Positive; —, Negative. The denominator is total number of examined samples and the molecule is number of examined positive samples

2.3 DEV 在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律

根据 2.2 各组织中检测到 DEV 阳性的时间可以判定 DEV 在人工感染鸭体内的侵染过程和分布规律: 感染后 4 h, 病毒可侵染至脾脏、胸腺和法氏囊; 感

染后 6 h, 病毒可侵染至肝脏、食道、十二指肠、直肠和肺脏。因此, 在急性病例中, 脾脏、法氏囊、胸腺、食道、肠道、肝脏和肺脏为 DEV 的主要靶器官; 接种后, 病毒首先在脾脏、胸腺、法氏囊中出现, 然后病毒迅速



A. 胸腺阳性(12 h,400 ×);B. 脾脏阳性(24 h,400 ×);C. 肝脏阳性(12 h,1 000 ×);D. 食道阳性(12 h,200 ×);E. 肠道阳性(12 h,400 ×);F. 法氏囊阳性(12 h,400 ×)

A. Positive thymus tissue(12 h,400 ×);B. Positive spleen(24 h,400 ×);C. Positive liver tissue(12 h,1 000 ×);D. Positive esophagus(12 h,200 ×);E. Positive intestine(12 h,400 ×);F. Positive bursa of Fabricius(12 h,400 ×)

图1 间接免疫荧光染色检测人工感染鸭各组织器官的 DEV

Fig. 1 The detection results of DEV antigen in each organ of artificially infected ducks by IFA

传播到肝脏、消化道和肺脏中。

3 讨论

目前检测 DEV 的方法较多,这些方法各有优、缺点。在血清学检测方法中,琼脂沉淀试验(AGP)具有简便、特异等优点,但据叶润全等^[9]报道,AGP 只能检测 DEV 抗体或鸭胚液中的病毒,不能直接检出鸭病料中的病毒;反向被动血凝试验也不适于检测少量 DEV^[10];对流免疫电泳^[11]和 Dot-ELISA^[12]可检测出现临床症状和病理变化的鸭病料中 DEV;微量固相放射免疫试验具有特异性强、敏感性高、快速和经济等特点,可检测鹅、鸭病料中的 DEV,且能在临床症状出现之前直接从肝、脾、脑和血清病料中检出,达到早期诊断的目的^[13];程安春等^[14]建立了检测 DEV 抗体的间接 ELISA,敏感、快速、准确性高、特异性强、重复性好且简便实用。近年来,PCR^[15,16]诊断技术作为检测 DEV 的一种新方法,具有特异、快速、敏感和高效的特点,但只能在液相中进行,且 PCR 扩增前,要把细胞破坏,从中提取核酸作为模板;但以上方法都不能在石蜡切片中检测 DEV。

免疫荧光技术检测临床标本中的病毒抗原已有

20 多年历史,是快速、有效而廉价的方法。但用免疫荧光染色和石蜡切片技术检测 DEV 感染鸭体内的分布规律和抗原定位,国内外未见报道。免疫荧光抗体技术结合了免疫学反应的特异性、组织标本能保持原细胞形态以及在黑色背景中发光物质易被发现的敏感性等优点,能弥补上述方法的不足,能确切地测出少量抗原(包括半抗原)在细胞或组织内的定位及分布,因而可对石蜡切片中的抗原进行定位。本研究表明,免疫荧光抗体技术检测石蜡切片中 DEV 的方法具有直观、特异性强的优点,对肝脏、脾脏、法氏囊、胸腺、消化道以及肺脏等组织的阳性检出率都较高,是对 DEV 进行检测和抗原定位的良好方法,该方法的建立为临床检测 DVE 提供了新的诊断方法,为研究和阐明 DEV 的致病机理提供有效的手段和数据,为临床上更好地预防控制鸭瘟的流行提供必要的参考资料,也为对存档蜡块的回溯性诊断研究和流行病学的调查提供有效的实验技术手段。但应注意,影响免疫荧光染色试验结果的因素较多,包括固定剂和粘片剂的选择,切片的厚度和制片过程中脱水、透明和烤片,抗原的修复,抗体的浓度、纯度和孵育时间,封片剂等。因此必须对实验条件进行优化并设置对照,从

而保证结果的准确可靠。

本试验在多数组织中检测到 DEV,符合该病毒泛嗜性的特点,可能是病毒经颈部皮下感染后,通过毛细血管从接种部位进入血液,或感染内皮细胞或免疫细胞后反复向血液内释放病毒而造成血源性播散。感染后 4 h 可在脾脏、胸腺和法氏囊中检测到 DEV,感染后 6 h 可在肝脏、十二指肠、直肠及肺脏中检测到 DEV,感染后 12 h 可在食道中检测到 DEV,表明接种后,病毒首先在脾脏、法氏囊、胸腺中出现,然后病毒迅速传播到肝脏、消化道和肺脏中。

本研究在肝脏、脾脏中检测到 DEV,与多数检测方法获得的结果一致^[17],而与 Islam 等的报道不完全一致^[18,19],其原因可能与其接种途径、接种量和实验鸭的品种、年龄、检测方法等有关。免疫器官脾脏、法氏囊和胸腺中最先检测到病毒,表明是 DEV 首先攻击的重要靶器官,与 Proctor^[6]、Shawky^[7]等通过病理学、免疫组化等检测手段获得的结果一致。免疫器官遭到攻击后有利于病毒能更长久地持续存在于宿主细胞来累积各类轻微的改变,最终导致细胞功能的丧失及组织破坏;并且增加了机会性感染和多重感染或超感染的发生率,加重及加速疾病的发展。

消化道的阳性结果说明其为靶器官之一。此外,肺脏组织中荧光数量虽然较少,但从感染后 6 h 到最后死亡鸭的肺脏组织一直都有明亮的荧光存在,可知肺组织也是鸭病毒性肠炎病毒的靶器官之一。

4 结 论

4.1 免疫荧光抗体染色法检测石蜡切片中的 DEV 具有直观、特异性强的优点,是对 DEV 进行检测、对存档蜡块回顾性诊断和抗原定位的良好方法。

4.1 在急性 DVE 病例中,脾脏、法氏囊、胸腺、食道、肠道、肝脏和肺脏为 DEV 的主要靶器官;接种后,病毒首先在脾脏、法氏囊、胸腺中出现,然后病毒迅速传播到肝脏、消化道和肺脏中。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京:中国农业出版社, 1999. 109~119.
- [2] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, *et al.* Diseases of Poultry[M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. 354~363.
- [3] Leibovitz L, Hwang J. Duck plague in American Continent[J]. Avian Diseases, 1968, 12: 361~378.
- [4] Leibovitz L. Gross and histopathological changes of duck

- plague (duck virus enteritis) [J]. American Journal of Veterinary Research, 1971, 32: 275~290.
- [5] Proctor S J. Pathogenesis of digestive tract lesions in duck plague[J]. Veterinary Pathology, 1975, 12: 349~361.
- [6] Proctor S J. Pathogenesis of duck plague in the bursa of Fabricius, thymus and spleen[J]. American Journal of Veterinary Research, 1976, 37: 427~431.
- [7] Shawky S. Target cells for duck enteritis virus in lymphoid organs[J]. Avian-Pathology, 2000, 29(6): 609~616.
- [8] 袁桂萍,程安春,汪名书,等. 鸭病毒性肠炎病毒强毒株的形态发生学与超微病理学研究[J]. 病毒学报, 2004, 20(4): 326~331.
- [9] 叶润全,黄引贤. 应用琼脂凝胶沉淀试验快速检测鸭瘟病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1991(2): 35~37.
- [10] Deng M Y, Burgess E C, Yuill T M. Detection of duck plague virus by reversepassive hemagglutination test[J]. Avian Disease, 1984, 28: 616~628.
- [11] John K, Sarma D K, Boro B R, *et al.* Counterimmunoelectrophoresis in duck plague virus antigen and antibody detection [J]. Indian Journal of Animal Sciences, 1989, 59(3): 358~359.
- [12] 徐耀基,黄引贤. Dot-ELISA 检测鸭瘟病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1992, 2: 19~21.
- [13] 徐耀基,黄引贤. 应用微量固相放射免疫测定法检测鸭瘟病毒的初步研究[J]. 中国畜禽传染病, 1992, 3: 35~38, 58.
- [14] 程安春,汪铭书,廖德惠,等. 酶联免疫吸附试验检测鸭瘟抗体的研究与应用[J]. 四川农业大学学报, 1997, 15(3): 379~384.
- [15] Hansen W R, Nashold S W, Docherty D E. Diagnosis of duck plague in waterfowl by polymerase chain reaction[J]. Avian Diseases, 2000, 44: 266~274.
- [16] 程安春,汪铭书,刘 菲,等. PCR 在鸭瘟临床诊断和免疫及致病机理研究中的初步应用[J]. 病毒学报, 2004, 20(4): 391~397.
- [17] Malmarugan S, Sulochana S. Detection of duck plague viral antigen in tissues by immuno-peroxidase test[J]. Indian Veterinary Journal, 2002, 79(2): 103~105.
- [18] Islam M R, Nessa J, Halder K M. An immunocytochemical study on the sequential tissue distribution of duck plague virus[J]. Avian Pathology, 1993, 22(2): 389~393.
- [19] Islam M R, Khan M A H N A. An immunocytochemical study on the sequential tissue distribution of duck plague virus [J]. Avian Pathology, 1995, 24(1): 189~194.