

# 间接免疫荧光检测石蜡切片中鸭肿头出血症病毒 及抗原定位方法的初步建立

张舍郁<sup>1</sup>, 程安春<sup>1,2</sup>, 汪铭书<sup>1,2</sup>, 沈婵娟<sup>1</sup>, 李传峰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学动物医学院禽病防治中心, 四川雅安 625014; <sup>2</sup>动物疾病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014)

**摘要:** 【目的】建立间接免疫荧光 (IFA) 检测石蜡切片中鸭肿头出血症病毒 (DSHDV) 的方法, 为 DSHDV 感染的实验室诊断、DSHDV 在感染鸭组织细胞中的亚细胞定位和动态研究提供有效的检测手段。【方法】用差速离心纯化 DSHDV, 将纯化 DSHDV 免疫家兔制备兔抗 DSHDV 高免血清, 并以 DEAE-SephadexA-50 柱层析纯化出兔抗 DSHDV IgG, 建立 IFA 检测石蜡切片中 DSHDV 的方法; 利用建立的 IFA 对 28 日龄鸭人工感染 DSHDV 死亡鸭不同组织器官以及临床样品进行检测。应用 PAGE 电泳分析 DSHDV 基因组特性。【结果】IFA 最佳条件为: 切片在  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸 (pH 6.0) 缓冲液微波修复 20 min 后, 以 10% 马血清 37℃ 下封闭 30 min, 然后加入 1:50 的一抗 4℃ 孵育过夜, 最后加入 1:100 FITC 标记的含 0.01% 伊文斯蓝的二抗 37℃ 孵育 30 min。IFA 检测 DSHDV 感染死亡鸭肝脏石蜡切片为阳性, 而检测鸭瘟、禽流感病毒 (H5N1)、鸭病毒性肝炎、鸭疫里默氏杆菌感染死亡鸭肝脏石蜡切片为阴性。IFA 检测 28 日龄人工感染 DSHDV 死亡鸭的不同组织器官, 心、肝、脾、胰、肺、肾、法氏囊、食管、气管、胸肌、胸腺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和直肠为阳性; 哈德氏腺、脑、皮肤、腺胃为阴性。阳性组织中病毒抗原主要分布在细胞浆。经甲醛固定保持 1~6 年的临床死亡鸭的病毒分离阳性肝脏, IFA 检测结果也呈阳性。DSHDV 具有呼肠弧病毒特征, 有 10 条分节段核酸, 呈“334”分布。【结论】建立的检测石蜡组织切片中 DSHDV 抗原的 IFA 具有直观、特异性强的优点, 应用于 DSHDV 在感染鸭组织细胞中的亚细胞定位具有良好效果, 可用于 DSHDV 感染的实验室诊断、病原在鸭组织细胞中分布研究。DSHDV 抗原存在感染细胞浆, 肠道、肾脏、法氏囊和胸腺是 DSHDV 侵害的主要靶器官。

**关键词:** 间接免疫荧光; 鸭病毒性肿头出血症病毒; 检测; 抗原定位

## Preliminary Establishment of the Indirect Immunofluorescence Assay for Detecting DSHDV in Paraffin-Embedded Tissues and Antigen Localization

ZHANG She-yu<sup>1</sup>, CHENG An-chun<sup>1,2</sup>, WANG Ming-shu<sup>1,2</sup>, SHEN Chan-juan<sup>1</sup>, LI Chuan-feng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, Sichuan;

<sup>2</sup>Key Laboratory Medicine of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, Sichuan)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study is to establish an indirect immunofluorescence assay (IFA) as a detection method of duck swollen head haemorrhagic disease virus (DSHDV) in paraffin-embedded tissue, subcellular antigen localization and dynamic distribution of DSHDV *in vivo*. 【Method】DSHDV was purified by differential centrifugation and rabbit anti-DSHDV antibodies were obtained from rabbits vaccinated with purified viruses. Then the rabbit anti-DSHDV IgG was purified through DEAE-SephadexA-50 chromatography. IFA was established and used to detect DSHDV antigen in paraffin-embedded tissues of 28-day-old death ducks which experimentally infected with DSHDV and clinical death ducks. PAGE was used to analyze the

收稿日期: 2006-11-08; 接受日期: 2007-11-16

基金项目: 国家科技攻关重大项目 (2004BA901A03)、国家科技支撑计划 (2007Z06-017)、教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (NCET-04-0906/NCET-06-0818)、四川省杰出青年基金后续项目 (07ZQ026-132)、四川省重大基础科研项目 (05JY029-109) 和四川省重点建设学科项目 (SZD0418)

作者简介: 张舍郁 (1981-), 男, 四川自贡人, 硕士研究生, 研究方向为动物微生物学。程安春和汪铭书通讯作者程。程安春 (1965-), 男, 布依族, 贵州长顺人, 教授, 博士, 研究方向为禽病学。汪铭书 (1964-), 女, 苗族, 贵州凯里人, 教授, 博士, 研究方向为动物传染病学与分子生物学。Tel: 0835-2885774; Fax: 0835-2885774; E-mail: chenganchun@vip.163.com

DSHDV nucleic acid genome characteristics. 【Result】 The optimum conditions of IFA were as follows: Antigen was retrieved by microwave in 0.01 mol·L<sup>-1</sup> citrate buffer solution (pH 6.0) for twenty minutes, and blocked with 10% horse serum at 37°C for 30 min. Slices were incubated overnight at 4°C with diluted primary antibody (1 : 50), and then incubated at 37°C for 30 min with diluted FITC-labelled-secondary antibody (1 : 100) which contains 0.01% Evans blue. IFA was adopted in detection of DSHDV antigen in the liver of dead ducks. The results were positive in dead ducks infected with DSHDV and negative in dead ducks infected with duck plague virus, avian influenza virus (H5N1), duck viral hepatitis virus and Riemerella Anatipestifer. IFA was also adopted in detection of the virulent DSHDV antigen in different organs of artificially infected dead 28-day-old ducks, and the viral antigen was detected in the heart, liver, spleen, pancreas, lung, kidney, bursa of fabricius, esophagus, trachea, muscle, thymus, duodenum, jejunum, ileum, cecum and rectum, while viral antigens was not detected in the harderian gland, brain, skin and proventriculus. The antigens distributed mainly in the cytoplasm of the infected cells. The result of IFA detected the positive liver of virus isolation from the clinical dead ducks which were formaldehyde-fixed and stored for 1-6 years is positive. DSHDV genome was related to reovirus, had ten segments of dsRNA, showed “334” distribution pattern. 【Conclusion】 IFA is a sensitive and specific method for the detection of DSHDV in paraffin-embedded tissues. It is effective in studying the antigen locations of DSHDV. IFA can be applied in diagnosing and studying the distribution of the DSHDV in duck tissues. The DSHDV antigens distributed in the cytoplasm of the infected cells. The target organ that DSHDV mainly attacked are intestines, kidney, bursa of fabricius and thymus.

Key words: Indirect immunofluorescence assay; DSHDV; Detection; Antigen localization

## 0 引言

【研究意义】鸭病毒性肿头出血症 (duck viral swollen head haemorrhagic disease, DVSHD) 是由鸭肿头出血症病毒 (duck swollen head haemorrhagic disease virus, DSHDV) 引起的一种以鸭头肿胀、眼结膜充血 (出血)、全身皮肤广泛性出血、肝肿胀呈土黄色并伴有出血斑点、体温 43°C 以上、排草绿色稀粪等为临床和病理特征的急性传染病。发病率 50%~100%，死亡率 40%~80% 甚至 100%，给中国养鸭业带来了巨大经济损失，建立有效的检测方法对于该病的防治具有重要的科学意义和经济价值<sup>[1]</sup>。【前人研究进展】程安春等首次报道了该病在四川省、重庆市等省份的发生和流行，造成严重死亡<sup>[1]</sup>。目前诊断检测 DSHDV 的方法较少，如：鸭胚及鸭胚成纤维细胞分离培养病毒、病毒致病性研究、病毒电镜观察等<sup>[1]</sup>，尚缺乏有效的血清学诊断方法。【本研究切入点】现有方法用于 DSHDV 的病原特性等方面的研究发挥了非常重要的作用，但却不能用于 DSHDV 感染的组织器官和细胞的抗原定位和直观判断。由于间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 具有特异、直观、敏感的特点，在许多疾病检测中得到广泛运用<sup>[2-5]</sup>，但国内外未见有间接免疫荧光方法 IFA 检测石蜡切片中 DSHDV 的相关报道。【拟解决的关键问题】优化病毒提纯方法，以获得纯化 DSHDV 抗原来制备抗体，建立检测 DSHDV 的间接免疫荧光方法，为 DSHDV 感染的实验室诊断、DSHDV 在感染

鸭体内的定位和动态分布提供有效的试验检测手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和试验动物

DSHDV CH-HY 株，为 F<sub>3</sub> 代鸭胚原代成纤维细胞培养毒，由动物疫病与人类健康四川省重点实验室分离、鉴定和保存；28 日龄樱桃谷肉鸭，来自非疫区种鸭，DVSHD 抗体阴性；2~3 kg 健康成年公兔，由四川农业大学实验动物室提供。

### 1.2 主要试剂

卡介苗 (批号 200511009-8) 购自成都生物制品研究所；离子交换层析介质 DEAE-SephadexA-50 购自 Amersham Pharmacia 公司；APES 粘片剂购自武汉博士德生物工程公司；供体马血清、牛血清白蛋白 (BSA)、FITC-羊抗兔 IgG 购自华美生物工程公司。

### 1.3 兔抗 DSHDV IgG 的制备

1.3.1 抗原的制备 参照 Grande<sup>[6]</sup>报道的方法采用差速离心纯化 DSHDV。考马斯亮蓝染色法测定病毒蛋白的含量。

1.3.2 兔抗 DSHDV 高免血清的制备和 IgG 的纯化 免疫兔子程序参照 Barkon<sup>[7]</sup>制备呼肠孤病毒高免血清的方法。最后一次免疫后 14 d 耳缘静脉采血分离血清，用琼脂扩散试验检测抗体滴度，当血清效价高于 1 : 64 时，颈动脉放血，分离和收集血清。用硫酸铵从血清中粗提 IgG，DEAE-SephadexA-50 离子交换层析纯化，PAGE 电泳染色为一条带时即为获得纯化的兔抗 DSHDV IgG，经浓缩、除菌后分装，-20°C 保存备用。

#### 1.4 间接免疫荧光条件的优化

参照文献[8],以随机组合的方法对以下各因素进行间接免疫荧光条件的筛选和优化。(1)固定液:分别以10%缓冲福尔马林溶液、4%多聚甲醛液固定组织;(2)黏片剂的选择和处理:分别以APES 37℃烘烤过夜、APES 60℃烘烤2 h和蛋白甘油60℃ 2 h处理玻片;(3)抗原修复:分别以0.01 mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸(pH 6.0)缓冲液微波修复20 min、1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸水溶液60℃ 30 min、200 μg·ml<sup>-1</sup>胰蛋白酶20 min和不修复处理;(4)洗涤液:分别以0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)、含0.05% Tween-20的0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)和含0.05% TritonX-100的0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)进行洗涤;(5)一抗稀释度:分别为1:50、1:100、1:200和1:300;(6)封闭液:分别以10%马血清和10% BSA进行封闭;(7)一抗孵育时间:4℃过夜和37℃ 2 h;(8)二抗稀释度:分别为1:25、1:50、1:100和1:200;(9)封片的缓冲甘油:以分析纯无荧光的甘油9份分别加入0.2 mol·L<sup>-1</sup>碳酸盐(pH 9.2)缓冲溶液1份或0.2 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)缓冲溶液1份配制的缓冲甘油封片;(10)背景衬染液:分别以0.01%伊文斯蓝和不衬染处理。

#### 1.5 特异性试验

1.5.1 阴性、阳性和空白对照 阴性对照为正常健康鸭组织切片;阳性对照为感染DSHDV死亡鸭的已知阳性组织切片;空白对照为以PBS代替DSHDV一抗。

1.5.2 吸收、替代、置换试验 吸收试验:DSHDV抗原与制备的兔抗DSHDV IgG等量混合,37℃孵育4 h,8 000 r/min,离心15 min,取上清代替兔抗DSHDV IgG进行免疫荧光试验;替代试验:兔正常血清替代兔抗DSHDV IgG或其中任何一种免疫试剂以PBS代替进行免疫荧光试验;置换试验:兔抗鸭病毒性肝炎、兔抗鸭瘟病毒抗体代替兔抗DSHDV IgG进行免疫荧光试验。

1.5.3 对其它病原人工感染致死鸭的组织检测 应用建立的方法对本实验室保存(甲醛固定)的鸭瘟病毒、禽流感病毒、鸭疫里默氏杆菌、鸭病毒性肝炎感染发病死亡鸭的肝组织进行检测。

1.5.4 标本自发荧光对照 标本加1~2滴0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4),观察。

#### 1.6 结果的判定

判断标准:按照荧光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:(1)没有出现黄绿色细胞的判为阴性;(2)组织中黄绿色

细胞零星分布且少于5%的判为弱阳性;(3)组织中黄绿色细胞分布比例为5%~50%为阳性;(4)组织中黄绿色细胞在组织中分布比例大于50%为强阳性。

#### 1.7 间接免疫荧光对鸭人工感染DSHDV病例的检测

试验鸭40只,随机分成2组,第一组肌肉注射CH-HY株病毒,0.2 ml/羽;另一组作正常对照。每日观察记录发病及死亡情况,发病死亡鸭取心、肝、脾、胰、肺、肾、法氏囊、食管、气管、哈德氏腺、皮肤、胸肌、胸腺、脑、十二指肠、空肠、回肠、直肠、盲肠和腺胃共20种器官固定,修块,水洗;常规病理包埋后将组织块切成4 μm,按本研究建立的方法进行检测和判定。

#### 1.8 对临床病例的检测

用建立的IFA对本实验室2000年以来用甲醛固定保存1~6年、经病毒分离鉴定确诊为DSHDV感染的临床送检鸭的肝脏20份进行检测。

#### 1.9 病毒基因组分析

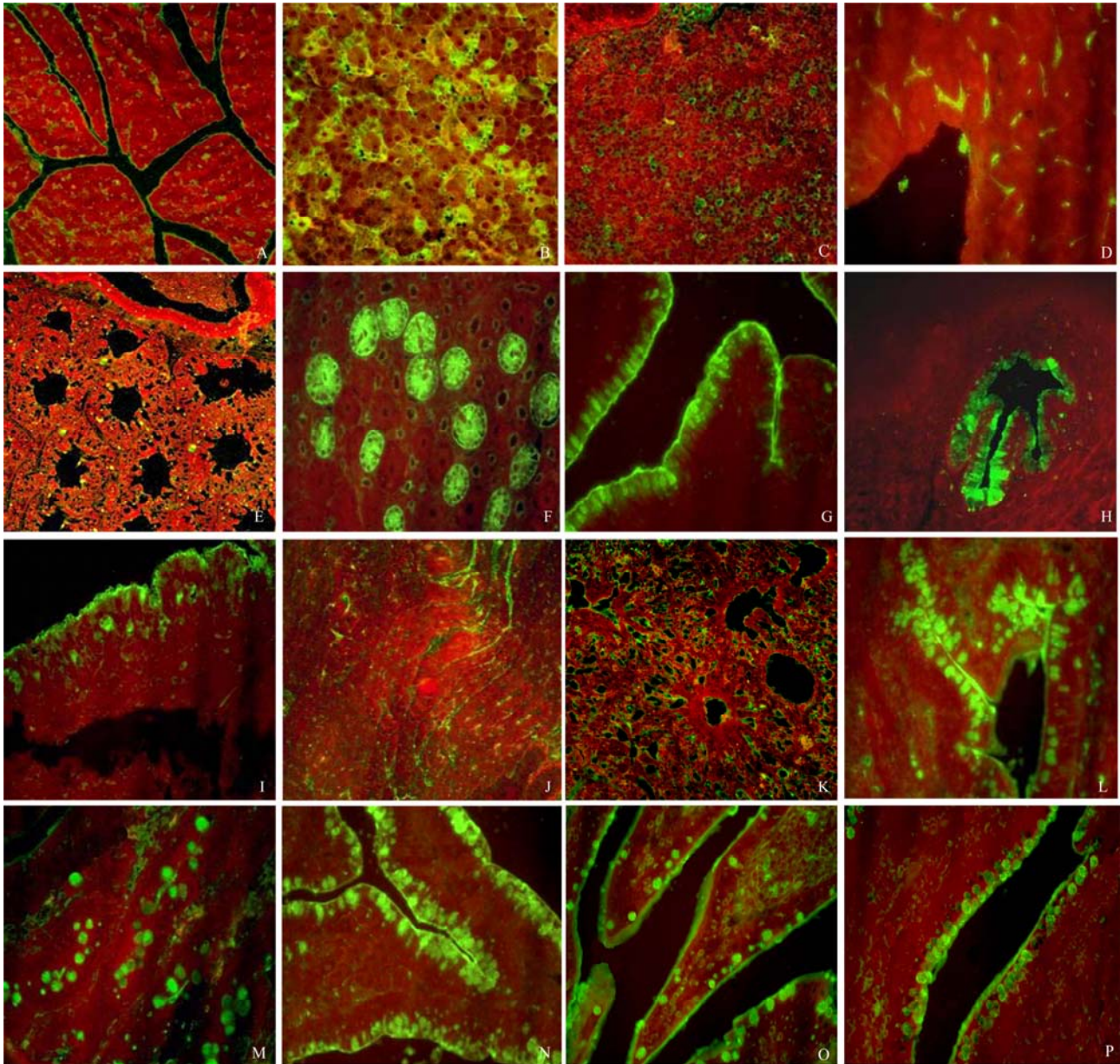
DSHDV鸭胚原代成纤维细胞上出现75%病变时收获,经超速冷冻离心机(Beckman公司,型号LE-80K)4℃ 55 000 r/min离心4 h进行病毒浓缩。浓缩后的病毒粒子,经Trizol's RNA试剂盒(宝生物公司,批号:B1303-1)抽提病毒核酸。最后,取病毒核酸5 μl上样于8%的聚丙烯酰胺凝胶中,于120 V,电泳6 h,硝酸银染色后观察并用凝胶成像系统(Bio-RAD公司2000型)拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 间接免疫荧光方法的建立和优化

经优化和筛选,IFA的最佳条件和程序为:(1)4%多聚甲醛液作固定剂,组织形态完整,抗原分布在特定位置。切片黏附于以APES处理的载玻片上37℃烘烤过夜后很少掉片。(2)用0.01 mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸(pH 6.0)缓冲液微波修复20 min,抗原分布在特定位置,且荧光亮度高。(3)含0.05% Tween-20的0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)洗涤3次×5 min, Tween-20可增加抗原的暴露程度,提高荧光亮度。(4)以10%马血清37℃下封闭30 min,滴加1:50的一抗4℃孵育过夜,最后加入1:100 FITC标记的含0.01%伊文斯蓝的二抗37℃孵育30 min。(5)以分析纯无荧光的甘油9份+0.2 mol·L<sup>-1</sup>碳酸盐(pH 9.2)缓冲溶液1份配制的封片剂封片,可获得荧光明亮的染色效果(图1)。

(6)如不使用伊文斯蓝衬染,组织背景为黑色,仅能



A 心脏: 阳性信号位于心肌纤维的肌浆中 (400×); B 肝脏: 阳性信号位于肝细胞的胞浆中 (600×); C 脾脏: 阳性信号位于淋巴细胞的胞浆中 (400×); D 胰腺: 阳性信号位于胰腺腺泡细胞的胞浆中 (400×); E 肺脏: 阳性信号位于肺泡细胞的胞浆中 (200×); F 肾脏: 阳性信号位于肾小管上皮细胞的胞浆内 (400×); G 法氏囊: 阳性信号位于黏膜上皮细胞的胞浆内 (400×); H 食管: 阳性信号位于食管上皮细胞的胞浆内 (400×); I 气管: 阳性信号位于支气管黏膜上皮细胞的胞浆内 (400×); J 胸肌: 阳性信号位于肌纤维细胞内 (400×); K 胸腺: 阳性信号位于胸腺上皮细胞的胞浆内 (400×); L 回肠: 阳性信号位于肠黏膜上皮细胞的胞浆内 (400×); M 盲肠: 阳性信号位于位于肠腺及肠黏膜上皮细胞胞浆内 (400×); N 十二指肠: 阳性信号位于肠黏膜上皮细胞胞浆内 (400×); O 空肠: 阳性信号位于位于肠黏膜上皮细胞胞浆内 (400×); P 直肠: 阳性信号位于位于肠黏膜上皮细胞胞浆内 (400×)

A. Heart: positive signal located in the cytoplasm of myocardial fibroblasts (400×); B. Liver: positive signal located in the cytoplasm of hepatic cells (600×); C. Spleen: positive signal located in the cytoplasm of splenic cells (400×); D. Pancreas: positive signal located in the cytoplasm of centroacinar cells (400×); E. Lung: positive signal located in the cytoplasm of alveolar cells (200×); F. Kidney: positive signal located in the cytoplasm of renal tubular epithelial cells (400×); G. Bursal: positive signal located in the cytoplasm of epidermic cell of bursa cloacalis (400×); H. Esophagus: positive signal located in the cytoplasm of esophageal epithelial cells (400×); I. Trachea: positive signal located in the cytoplasm of branch trachea (400×); J. Muscle: positive signal located in the cytoplasm of muscle fibers (400×); K. Thymus: positive signal located in the cytoplasm of thymic epithelial cells (400×); L. Ileum: positive signal located in the cytoplasm of intestinal epithelial cells (400×); M. Caecum: positive signal located in the cytoplasm of intestinal epithelial cells (400×); N. Duodenum: positive signal located in the cytoplasm of intestinal epithelial cells (400×); O. Jejunum: positive signal located in the cytoplasm of intestinal epithelial cells (400×); P. Rectum: positive signal located in the cytoplasm of intestinal epithelial cells (400×)

图 1 IFA 对 DSHDV 人工感染发病死亡鸭组织器官检测

Fig. 1 The tissues of dead ducks which experimentally infected with DSHDV using IFA



检测到阳性信号, 但组织器官不能辨认, 不能对抗原定位。

## 2.2 特异性试验

阴性对照、吸收试验、替代试验、置换试验、对其它病原(鸭瘟病毒、禽流感病毒、鸭疫里默氏杆菌、鸭病毒性肝炎病毒)感染致死鸭的肝组织以及标本自发荧光试验均无黄绿色荧光, 呈阴性; 阳性对照发出明亮的黄绿色荧光, 呈阳性。

## 2.3 间接免疫荧光对鸭人工感染 DSHDV 病例的检测

IFA 对 DSHDV 人工感染后发病死亡的鸭的心、肝、脾、胰、肺、肾、法氏囊、食管、气管、胸肌、胸腺、十二指肠、空肠、回肠、直肠、盲肠免疫荧光呈阳性或强阳性。结果如下: (1) 心脏: 阳性, 心脏弥散性的分布有黄绿色荧光, 阳性信号主要分布在心肌膜心肌纤维的肌浆中, 以黄绿色梭状荧光为主(图 1-A); (2) 肝脏: 阳性, 阳性信号主要位于肝小叶间的结缔组织和肝索区、肝血窦区等呈散在分布, 阳性颗粒分布于肝细胞细胞浆, 荧光以圆形和椭圆形为主(图 1-B); (3) 脾脏: 阳性, 弥散性分布有大量的黄绿色颗粒, 以圆形为主(图 1-C); (4) 胰: 阳性, 阳性信号散分布于外分泌部腺泡上皮细胞和腺泡心细胞的胞浆中, 黄绿色荧光以梭状为主(图 1-D); (5) 肺: 阳性, 弥散性分布有少量黄绿色荧光, 部分为点状或梭状(图 1-E); (6) 肾脏: 强阳性, 荧光主要分布在肾小管上皮细胞浆(图 1-F); (7) 法氏囊: 强阳性, 黄绿色荧光主要分布在法氏囊黏膜上皮细胞浆(图 1-G); (8) 食管: 阳性, 阳性信号主要分布于黏膜肌层(图 1-H); (9) 气管: 阳性, 阳性信号分布于气管黏膜的杯状细胞(图 1-I); (10) 胸肌: 阳性, 胸肌中弥散分布少量的黄绿色荧光, 主要以点状圆形或者无规则形状(图 1-J); (11) 胸腺: 强阳性, 在胸腺小体, 胸腺的皮质和髓质都弥散性地分布有黄绿色细胞(图 1-K); (12) 十二指肠、空肠、直肠、回肠、盲肠: 强阳性, 肠绒毛上皮细胞浆、肠腺细胞有浓黄绿色(图 1-L~P); (13) 哈德氏腺、脑、皮肤、腺胃呈阴性。以上检测到的阳性组织器官, DSHDV 抗原分布于宿主细胞浆。

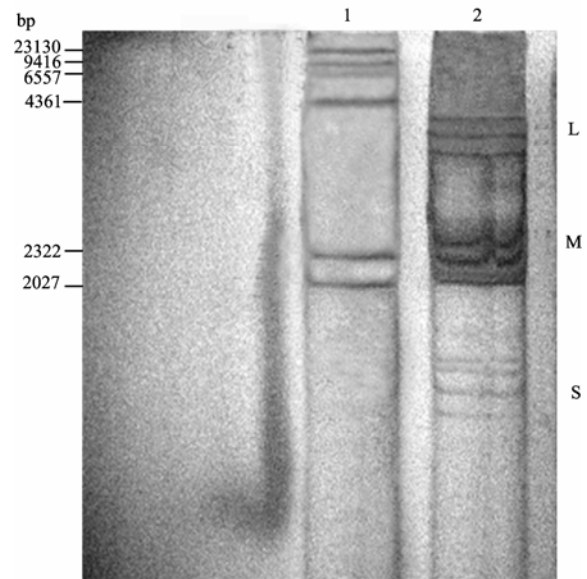
## 2.4 临床病例的检测

对本实验室用甲醛固定保存、经病毒分离鉴定确诊为 DSHDV 感染的临床送检鸭的 20 份肝脏样品进行检测法检测为全部阳性。

## 2.5 病毒基因组特性

病毒核酸的 PAGE 结果显示: 该病毒核酸存在 3

个明显的节段区, 共 10 条核酸节段(图 2), 由此说明 DSHDV 为分节段的 RNA 病毒, 呈现“334”分布, 具有呼肠孤病毒的特征<sup>[26]</sup>。



1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III; 2. DSHDV

图 2 DSHDV 核酸的 PAGE 电泳

Fig. 2 PAGE of DSHDV nucleic acid

## 3 讨论

### 3.1 间接免疫荧光方法的建立与优化

抗体的特异性是进行免疫荧光试验的关键, 本试验制备第一抗体的抗原是利用差速离心的方法<sup>[6,9]</sup>提纯 DSHDV, 该方法简便, 用该病毒抗原制备的 IgG 经纯化后 PAGE 检测为一条带, 特异性检测结果表明建立的 IFA 只对 DSHDV 感染致死鸭的肝组织出现阳性反应而与鸭的常见感染如鸭瘟病毒、禽流感病毒、鸭疫里默氏杆菌和鸭病毒性肝炎病毒感染致死鸭的肝组织呈现阴性反应, 说明该法具有良好特异性; 检测临床感染病例的结果与病毒分离的结果相一致, 是检测 DSHDV 临床感染的一种有效手段。

染色过程中消除非特异性的染色也是试验成功的重要因素, 进行本试验时应应对以下几个方面的因素给以充分考虑: (1) 抗原修复方面: 抗原修复可将固定时分子之间所形成的交联破坏而恢复抗原的原有空间形态。本试验以  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸 (pH 6.0) 缓冲液微波修复使抗原充分暴露<sup>[10]</sup>, 能明显提高免疫荧光染色的强度和降低背景, 而且比较经济方便<sup>[11]</sup>。据

Battifora 等<sup>[12]</sup>报道, 胰蛋白酶修复有较好的效果, 而本研究用胰蛋白酶修复的结果是组织间隙不清晰, 效果没有微波修复的好。(2) 洗涤液以含 0.05% Tween-20 的  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS (pH 7.4) 时比单独的 PBS 具有降低背景染色和提高免疫荧光染色的作用, 主要是去污剂能够溶解细胞膜上的脂质, 增强细胞通透性, 提高免疫荧光的染色效果<sup>[13]</sup>; (3) 在保证理想的阳性结果条件下, 将抗体的稀释度提高可防止非特异性背景染色, 本试验当一抗稀释度为 1:50, 第二抗体的稀释度为 1:100 时, 具有良好的阳性信号和低背景染色。(4) 封闭血清: 用 10% 马血清或 10% BSA 室温封闭 0.5 h 效果相当, 都可以降低背景染色, 而马血清比 BSA 廉价, 本试验采用 10% 马血清封闭 30 min。

(5) 增强染色的同时还要突出与背景的反差, 以利于结果的判定。本研究用 0.01% 的伊文思蓝 (Evans blue) 进行衬染<sup>[14,15]</sup>, 可将背景细胞和组织染成砖红色, 与特异性黄绿色荧光形成鲜明对比, 减少了非特异荧光。从试验结果表明, 利用伊文思蓝衬染处理后, 大大提高了组织结构的分辨率, 对于 DSHDV 在感染鸭组织细胞中的亚细胞定位具有良好效果, 可以进一步对病毒的发病机理以及繁殖特性提供试验依据。相反, 不做背景衬染处理, 背景为黑色, 只能定性地判断阳性信号的有无, 不能观察组织结构, 不能很好地对病毒在组织中的细胞定位进行研究。

免疫荧光的结果判定主要靠荧光的染色强度和分布的量来决定, 选择优化条件对提高荧光分析的效能和改进荧光染色方法有重要意义。影响荧光的染色强度的因素有<sup>[16,17]</sup>: (1) pH 的影响: 改变 pH 可引起荧光色素光谱的变化, 并影响荧光色素吸收光能的能力和荧光效率。本研究通过筛选甘油封片剂的 pH 对荧光强度影响。结果表明, 分析纯无荧光的甘油 9 份 +  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  碳酸盐 (pH 9.2) 缓冲溶液混合作封片剂能使荧光染料发出最强荧光。(2) 荧光染色液的温度: 一般在  $30^\circ\text{C}$  即开始出现温度对荧光的熄灭作用。但本研究在室温和  $37^\circ\text{C}$  进行对照试验时, 两者的荧光强度没有明显区别。(3) 避免和一些对荧光有熄灭作用的物质接触。如具有氧化作用的物质, 某些金属离子等。

### 3.2 间接免疫荧光法与其它检测方法的比较

DSHDV 在实验室诊断方面报道较少, 但对其它病毒有大量的诊断方法, 如: Yolken 等<sup>[18]</sup>利用直接免疫荧光技术检测呼肠孤病毒; Uchiyama<sup>[19]</sup>运用荧光核酸酶反转录聚合酶链式反应 (fnRT-PCR) 精确检测到

感染了呼肠孤病毒的啮齿目动物; Mccammon 等<sup>[20]</sup>利用放射免疫荧光检测出细胞培养的呼肠孤病毒; Liu<sup>[21]</sup>采用 ELISA 检测禽呼肠孤病毒抗体; Bruhn<sup>[22]</sup>建立了 RT-PCR 法检测禽呼肠孤病毒; Gouvea<sup>[23]</sup>对比了 6 株禽呼肠孤病毒的病原性研究。与这些方法比较, 本研究建立的间接免疫荧光检测鸭组织中的 DSHDV 具有以下特点: (1) 能够对抗原进行精确定位, 可避免在采样过程中各组织交叉污染而造成检测结果的可靠性降低。(2) 特异性强, 灵敏度高, 本试验通过免疫荧光检测鸭瘟、禽流感病毒、鸭病毒性肝炎、鸭疫里默氏杆菌和正常鸭组织呈阴性。(3) 间接免疫荧光法染色方法具有检测速度快的优势并且其准确度没有受到影响。但是本方法的缺点是荧光容易猝灭, 切片不能长期保存, 需要荧光显微镜观察, 由于可视性较差, 不能看到组织中的详细结构。

### 3.3 DSHDV 在组织器官的分布与病毒对机体损害的影响

通过建立的间接免疫荧光法在鸭重要组织器官的细胞浆中检测到阳性信号, 证明 DSHDV 是一种胞浆内复制病毒, 具有 RNA 病毒的特征<sup>[24,25]</sup>。在肠道和肾 (特别是肠道上皮细胞和肾小管上皮细胞) 检测到强阳性信号, 表明 DSHDV 可以通过尿液、粪便等排泄物向体外排毒, 成为疾病流行和爆发的重要传染源。试验结果表明肠道和肝脏易于被病毒所吸附, 成为病毒入侵的靶器官。中枢免疫器官脾脏、胸腺和法氏囊检测到阳性或强阳性信号, 说明免疫系统遭到的严重侵害可能是该病潜伏期和病程短的重要原因。肾脏、法氏囊、胸腺、肠道呈现强阳性反应, 表明是 DSHDV 侵害的主要靶器官。本研究未在脑、腺胃、哈德氏腺、皮肤组织检测出阳性信号, 但在临床症状中可以看到脑、腺胃、哈德氏腺、皮肤组织具有明显病理变化, 表明这些组织不是本方法检测的理想材料。

## 4 结论

本研究建立的检测石蜡组织切片中 DSHDV 抗原的 IFA 具有直观、特异性强的优点, 可用于 DSHDV 感染鸭的实验室诊断、病原在鸭组织细胞中的亚细胞定位和分布研究。IFA 检测 28 日龄鸭人工感染 DSHDV 死亡鸭的心、肝、脾、胰、肺、肾、法氏囊、食管、气管、胸肌、胸腺、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和直肠为阳性; 哈德氏腺、脑、皮肤、腺胃为阴性; 阳性组织中病毒抗原主要分布在细胞浆。肠道、肾脏、法氏囊和胸腺是 DSHDV 侵害的主要靶器官。

## References

- [1] 程安春, 汪铭书, 周毅, 刘菲, 宋涌, 郭宇飞, 韩晓英, 袁桂萍, 徐超, 廖永洪, 方鹏飞, 刘兆宇. 一种新发现的鸭病毒性肿头出血症的研究. *中国兽医科技*, 2003, 10(33): 15-19.  
Cheng A C, Wang M S, Zhou Y, Liu F, Song Y, Guo Y F, Han X Y, Yuan G P, Xu C, Liao Y H, Fang P F, Liu Z Y. Studies on duck virus duck swollen head haemorrhagic disease. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2003, 10(33): 15-19. (in Chinese)
- [2] Nicholson W L, Comer J A, Sumner J W, Gingrich-baker C, Coughlin R T, Magnarelli L A, Olson J G, Childs J E. An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(6): 1510-1516.
- [3] Diederer B M W, Kluytmans J A J W, Peeters M F. Evaluation of vircell enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for detection of antibodies against *Legionella pneumophila*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, 13(3): 361-364.
- [4] Borek A P, Clemens S H, Gaskins V K, Aird D Z, Valsamakis A. Respiratory syncytial virus detection by remel xpect, binax now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 1105-1107.
- [5] Lennette E T, Karpatkin S, Levy J A. Indirect immunofluorescence assay for antibodies to human immunodeficiency. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(2): 199-202.
- [6] Grande A, Benavente J. Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *Journal of Virological Methods*, 2000, 85(1): 43-54.
- [7] Barkon M L, Haller B L, Virgin H W. Circulating immunoglobulin can play a critical role in clearance of intestinal reovirus infection. *Journal of Virology*, 1996, 70(2): 1109-1116.
- [8] Homburger H A, Cahen Y D, Griffiths J, Jacob G L. Detection of antinuclear antibodies: comparative evaluation of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1998, 122(11): 993-999.
- [9] Villegas G A, Argüelles M H, Castello A A, Mas N J, Glikmann G. A rapid method to produce high yields of purified rotavirus particles. *Journal of Virological Methods*, 2002, 104(1): 9-19.
- [10] Werner M, von Wasielewski R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 1996, 105(4): 253-260.
- [11] Kahveci Z, Minbay F Z, Noyan S, Cavusoglu I. A comparison of microwave heating and proteolytic pretreatment antigen retrieval techniques in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 2003, 78(2): 119-128.
- [12] Battifora H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1986, 34(8): 1095-1100.
- [13] Hazelbag H M, Broek L J, Dorst E B, Offerhaus G J, Fleuren G J, Hogendoorn P C. Immunostaining of chain-specific keratins on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: a comparison of various antigen retrieval systems using microwave heating and proteolytic pre-treatments. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1995, 43(4): 429-437.
- [14] Inoue N, Mar E, Dollard S C, Pau C, Zheng Q, Pellett P E. New immunofluorescence assays for detection of human herpesvirus 8-specific antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, 7(3): 427-435.
- [15] Jenson H B, Grant G M, Ench Y, Heard P, Thomas C A, Hilsenbeck S G, Moyer M P. Immunofluorescence microscopy and flow cytometry characterization of chemical induction of latent Epstein-Barr virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5(1): 91-97.
- [16] Vadivelu J, Puthuchery S D. Diagnostic and prognostic value of an immunofluorescent assay for melioidosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000, 62(2): 297-300.
- [17] Graham D A, Foster J C, German A, McLaren I E, Adair B M, Merza M. Evaluation of an immunofluorescent antibody test to detect bovine herpesvirus 1-specific IgM. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11(4): 324-329.
- [18] Yolken R H, Wyatt R G, Kalica A R, Kim H W, Brandt C D, Parroitt R H, Kapikian A Z, Chanock R M. Use of a free viral immunofluorescence assay to detect human reovirus-like agent in human stools. *Infection and Immunity*, 1977, 16(2): 467-470.
- [19] Uchiyama A, Besselsen D G. Detection of Reovirus type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Laboratory Animals*, 2003, (37): 352-359.
- [20] Mccammon J R. Radioimmunofluorescent antibody technique for detection of reovirus antigen in cell culture. *Infection and Immunity*, 1976, 14(3): 811-815.
- [21] Liu H J, Kuo L C, Hu Y C, Liao M H, Lien Y Y. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. *Journal of Virological Methods*, 2002, 102(1): 129-138.
- [22] Bruhn S, Bruckner L, Ottiger H P. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *Journal of Virological Methods*, 2005, 123(1): 179-186.
- [23] Gouvea V, Schnitzer T J. Pathogenicity of avian reoviruses: Examination of six isolates and a vaccine strain. *Infection and Immunity*, 1982, 38(2): 731-738.
- [24] Costas C, Costas J M, Bodelón G, Benavente J. The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *Journal of Virology*, 2005, 79(4): 2141-2150.
- [25] Ogert R A, Lee L H, Beemon K L. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *Journal of Virology*, 1996, 70(6): 3834-3843.
- [26] Ramig R F, Cross R K, Fields B N. Genome RNAs and polypeptides of reovirus serotypes 1, 2, and 3. *Journal of Virology*, 1977, 22(3): 726-733.

(责任编辑 林鉴非)