# 鸭肠炎病毒强毒参考株在感染鸭体内的动态分布研究

文晶亮,李俊平,李启红,李 岭,孙 淼,李慧姣,杨承槐\*,夏业才\*

[收稿日期] 2014-09-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0010-07 [中图分类号] 8851.32

[摘 要] 为研究鸭肠炎病毒(DEV)强毒株在感染鸭体内的动态分布规律,根据 DEV 的 gD 基因 序列设计检测引物 RT-gDF 和 RT-gDR,建立了特异性强、敏感性高、重复性好的检测 DEV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。应用已建立的方法,对 DEV 强毒参考株感染鸭的组织脏器进行了定量检测。结果显示,接种后 6 h 即可在所有受检组织中检测到 DEV DNA,随着病程发展, DNA 拷贝数持续升高,直至接种 5 d 后感染鸭全部死亡。其中结肠病毒 DNA 拷贝数为最高,达到 10<sup>13.26</sup> copies/g,法氏囊、肝脏和盲肠次之,约 10<sup>12</sup> copies/g。证实了 DEV 强毒对感染鸭的免疫器官、神经组织和消化系统均具有广泛的嗜性。

[关键词] 鸭肠炎病毒;实时荧光定量 PCR;鸭;动态分布

## Dynamic Distribution of Duck Enteritis Virus Standard Challenge Strain in Experimentally Infected Ducklings

WEN Jing-liang, LI Jun-ping, LI Qi-hong, LI Ling, SUN Miao, LI Hui-jiao, YANG Cheng-huai<sup>\*</sup>, XIA Ye-cai<sup>\*</sup> (China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

基金项目:科技部科技基础性工作专项"重大动物疫病病原及相关制品标准物质研究(2008FY130100)" 作者简介:文晶亮,硕士研究生,从事禽病研究。

通讯作者:杨承槐, E-mail: ychenghuai@163.com; 夏业才, E-mail: xiayecai@ivdc.gov.cn

- [5] Zhu J, Guo L, Min B, et al. Growth factor independent 1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation [J]. Immunity, 2002, 16(5): 733-744.
- [6] Cooper A M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 393-422.
- [7] 杨颖乔,彭圣威. 肺结核患者细胞因子水平测定的临床研究[J]. 咸宁学院学报(医学版), 2009, 23(3): 211-212.
- [8] 任伟,杨利峰,赵德民.实时荧光定量PCR构建朊病毒相关 蛋白 p38MAPK标准品质粒和标准曲线[J].中国兽药杂志, 2010,44(10):34-36.
- [9] Rajesh Kumar Dutta, Mahesh Kathania. IL-6 inhibits IFN-γ induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, (44) : 942-954.

- [10] 卜文甲. 家畜结核分枝杆菌致病性的分析[J].养殖技术顾问, 2012, (11): 148.
- [11] Griffin J F T, Rodgersa C R, LiggettaS, et al. Tuberculosis in ruminants: characteristics of intra-tonsilar Mycobacterium bovis infection models in cattle and deer[J]. Tuberculosis, 2006, 86: 404-418.
- [12] 梅 英,刘长安,龚建平. 定量 PCR 的研究进展[J]. 国外医 学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(1): 23-26.
- [13] van der Velden V H, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by realtime quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects[J]. Leukemia, 2003, 17 (6) :1013-1034.

(编辑:李文平)

• 11 •

Abstract: To explore the dynamic distribution of duck enteritis virus challenge standard strain (DEV CSC) in experimentally infected ducklings, the specific primers (RT-gDF and RT-gDR) were designed according to the gene DEV gD, and the SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for virulent strain with satisfaction of specificity, sensibility and repeatability was established. Copies of DEV DNA were quantified in the collected tissues by the fluorescent quantitative PCR method. In result, DEV CSC DNA were firstly detected in all the samples at six hours after inoculation and the DNA copies subsequently continued to rise till the death of all the ducklings infected with DEV CSC virulent strain five days after inoculation. The DNA copies of DEV CSC strain in  $colon(10^{13.26} copies/g)$  of dead ducklings was highest, and then came to bursa of Fabricius, caecum and liver, about  $10^{12} copies/g$ . The results above comfirmed that the virulent strain CSC had broad tissue tropism on immune organs, nerve tissue and digestive system of infected ducks.

Key words: duck enteritis virus; real-time fluorescent quantitative PCR; ducklings; dynamic distribution

鸭病毒性肠炎,又名鸭瘟,是由鸭肠炎病毒 (Duck enteritis virus, DEV)引起的常见于鸭、鹅和 其他雁形目禽类的一种急性、热性、败血性、高度接 触性传染病<sup>[1]</sup>。发病率和死亡率都很高,给养鸭业 带来了巨大损失。自 Baudet 等<sup>[2]</sup>首次在荷兰报道 该病后,目前国内、外已建立大量 DEV 的诊断方 法,主要包括病毒分离鉴定、琼脂糖凝胶扩散试验、 酶联免疫吸附试验(ELISA)、PCR 等<sup>[3-5]</sup>,为鸭瘟的 快速诊断和有效防控提供了有力的技术支撑,但这 些方法在精确定量检测方面存在不足。

随着现代分子生物学的发展,实时荧光定量 PCR 作为一种新的可以精确定量的检测方法,在诊 断、检测 DEV 方面取得了快速发展。SYBR Green I 染料法实验设计简单,成本相对低廉,对多种病 原定量检测方面均取得了广泛的应用。汤承<sup>[6]</sup>和 Yang<sup>[7]</sup>等分别建立了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,对鸭瘟的快速诊断、分子流行病学研究 以及进出口检疫均具有较大的实用价值。本研究 根据 DEV gD 基因的高度保守序列设计引物,建立 了检测 DEV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,对 DEV 强毒参考株在感染鸭体内的动态分 布规律进行研究,旨在揭示 DEV 强毒在自然宿主 体内组织嗜性、增殖规律,为阐明 DEV 分子致病机 理奠定基础。

#### 1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌毒株 鸭肠炎病毒强毒参考株 (DEV

CSC)、鸭病毒性肝炎病毒、新城疫病毒、鸭疫里默 氏杆菌、巴氏杆菌均由中国兽医药品监察所菌种保 藏中心提供。

1.1.2 试验动物 3 周龄易感鸭(DEV 中和抗体
 <1:2),购于北京某鸭厂。</li>

1.1.3 主要试剂 高纯度质粒小提中量试剂盒、琼 脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、蛋白酶 K 溶液、E. coli
DH5α 感受态细胞,购于天根生化科技有限公司;
pMD18 - T 载体、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 BamH I、Xba I、Maker IV、Maker V、T4 DNA 连接酶、
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>II 试剂均购自大连宝生物
(Takara) 工程有限公司; Wizard <sup>®</sup> Genomic DNA
Purification Kit 购自 Promega 公司。

1.1.4 主要仪器 BIO-RAD IQ<sup>™</sup>5 实时荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 检测引物的设计与合成 根据 DEV CSC 株gD 基因上小片段高度保守的特定序列,用软件
Premier 5.0 设计一对特异性引物:RT - gDF:
5'-GTATTTGTGGGTGGGTCA-3'; RT - gDR:
5'-CAAGCCTATCCTCTTCGTC-3' 由上海Invitrogen
公司合成,理论扩增片段大小为 123 bp 左右。

1.2.2 DEV DNA 的提取 按参考文献[8]进行。

1.2.3 标准品的制备 根据 DEV CSC 株基因组序 列(Accession No.JQ673560),合成引物用于扩增 gD 基因,gD - F1:5' TTGCATCCGGTAAGACCCAG-GATTTG 3';(划线部分为 BamH I 酶切位点); gD-R1.5' GCTCTAGATATGGCGCACTGGACAAT 3': (划线部分为 Xba I 酶切位点):由上海Invitrogen生 物公司合成,理论扩增片段大小为1393 bp。以 DEV CSC 株的 DNA 为模板,gD-F1、gD-R1 为引物 进行 PCR 扩增。反应体系:10×Buffer 2.5 uL. dNTP 2 µL, gD-F1、gD-R1 各 1 µL, Ex Taq 酶 0.2 μL, DEV DNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 16.3 μL。反应程 序:95 °C 3 min:95 °C 1 min::51 °C 1 min:72 °C 2 min. 重复 30 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。用琼 脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 扩增产 物,克隆至 pMD-18T 载体。

1.2.4 标准曲线的绘制 用紫外分光光度计测 定阳性质粒的核酸浓度,根据下列公式计算拷贝数;

拷贝数= 6.02×10<sup>23</sup>×核酸浓度×10<sup>-9</sup> DNA 碱基数×660

式中,拷贝数单位为 copies/µL,核酸浓度单位 为 ng/µL。

将标准品作10倍连续稀释, 选取适宜稀释度的 标准品作为模板进行扩增。反应体系·2×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10 µL, RT - gDF、RT - gDR 各 0.8 μL,标准品 2 μL,ddH,O 6.4 μL。反应程序:热 启动95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,47.7 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s,收集荧光信号,设置 45 个循环。溶解曲线程 序: 55~95 ℃,梯度为0.5 ℃/30 s,设置 81 个循环。 熔解曲线程序运行完毕后自动生成熔解曲线,并得 出 Ct 值与拷贝数之间的线性回归方程。

1.2.5 特异性实验 应用建立的方法对鸭病毒性 肝炎病毒 cDNA、新城疫病毒 cDNA、鸭疫里氏杆菌 DNA、巴氏杆菌 DNA 进行检测。

1.2.6 敏感性实验 应用建立的方法对不同稀释 度标准品进行检测。

1.2.7 样品的采集及处理 随机选取3周龄雏鸭24 只,每只腿部肌内注射的 DEV CSC 1 mL(含 1000 MLD),接种后于1、3、6、12、24 h,然后每隔 24 h 随机剖 杀2只,采集胸腺、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰腺、 十二指肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、法氏囊、大脑、三叉 神经、血清、泄殖腔拭子。另取4只3周龄雏鸭腿部肌 内注射1mL 生理盐水作为对照,于接种后1h 和实验 结束时随机剖杀1只。采用 WIZARD Genomic DNA purification KIT 试剂盒提取样品的 DNA,应用建立的 方法检测样品中的病毒 DNA 拷贝数。

1.2.8 数据分析 根据样品的 Ct 值,利用建立的

Ct 值与拷贝数的线性回归方程, BIO-RAD IO<sup>™</sup>5 Optical Detetion System Software (Version 2.0) 自动 计算出每个样品中病毒的 DNA 拷贝数,利用 graph prism 软件计算病毒拷贝数的平均值和标准差。

## 2 结果

2.1 gD 基因 PCR 扩增结果 采用引物 gD-F1 和 gD-R1 对提取的 DEV CSC 株核酸 DNA 进行 PCR 扩增.PCR产物用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳,结果 出现了1393 bp 的特异性扩增条带, 与预计的目的 片段大小一致(图1)。将 PCR 产物克隆至 pMD18T 载体,经 PCR 和酶切鉴定(图 2),获得了 标准品质粒 pMD18T-gD。



1~4: gD 基因的扩增产物;5: 去离子水;M: Marker V 图 1 gD 基因 PCR 扩增结果



1: PCR 扩增产物; 2: BamH I、Xba I 双酶切产物; M: Marker IV 图 2 pMD18T-gD 的 PCR 及双酶切鉴定结果

标准曲线的建立 选取 9.072×10<sup>6</sup>~9.072× 2.2  $10^1$  copies/ $\mu$ L共6个稀释梯度的标准品作为模板进 行荧光定量 PCR 反应,绘制出荧光定量反应的标准 曲线(图 3),标准曲线公式为Y = -3.466x + 36.99, 其斜率为-3.466、截距为 36.99、相关系数为 1.0、反 应扩增效率为94.3%。





2.3 特异性实验 以 DEV CSC DNA、对照鸭正常 组织 DNA 以及其他病原体(鸭病毒性肝炎病毒、鸡 新城疫病毒、鸭巴氏杆菌、鸭疫里默氏杆菌)的核酸 样品与标准品一起作为模板进行荧光定量 PCR 反 应,结果表明,只有 DEV CSC 核酸样品和标准品出 现了明显的扩增曲线,其余核酸样品均没有出现扩 增曲线(图 4)。

2.4 敏感性实验 取 9.072×10<sup>6</sup>~9.072×10<sup>-1</sup> copies 稀释梯度的标准品作为模板,应用已建立荧光定量 PCR 方法进行扩增。结果显示,该方法可检测出 9.072 copies 的 pMD18T-gD(图 5)。



1:4.77×10<sup>7</sup> copies;2:4.77×10<sup>6</sup> copies;3:4.77×10<sup>5</sup> copies;4:4.77×10<sup>4</sup> copies;5:4.77×10<sup>3</sup> copies;6:4.77×10<sup>2</sup> copies; 7:DEVCSC;8:鸭病毒性肝炎病毒;9:鸡新城疫病毒;10:鸭巴氏杆菌;11:鸭疫里默氏杆菌;12:对照鸭组织核酸样品



图 4 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法检测鸭瘟强毒参考株的特异性试验

8.9.072×10<sup>2</sup> copies;2:9.072×10<sup>2</sup> copies;6:9.072×10<sup>1</sup> copies;7:9.072 copies;8:9.072×10<sup>-1</sup> copies
 8.9.072×10<sup>2</sup> copies;6:9.072×10<sup>1</sup> copies;7:9.072 copies;8:9.072×10<sup>-1</sup> copies
 8.9.072×10<sup>2</sup> copies;6:9.072×10<sup>1</sup> copies;7:9.072 copies;8:9.072×10<sup>-1</sup> copies
 9.072×10<sup>2</sup> copies;6:9.072×10<sup>1</sup> copies;7:9.072 copies;8:9.072×10<sup>-1</sup> copies

2.5 DEV CSC 在接种鸭体内的动态分布 DEV CSC 强毒株肌内注射 1 h,除了胸腺以外其余所有 受检组织中均可检测到病毒 DNA,接种后 6 h 在所 有受检组织中均可检测到。在接种后 1 h~1 d 免疫鸭 体内病毒 DNA 整体上保持在 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> copies/g 的水 平波动,接种后 2 d 病毒 DNA 拷贝数开始迅速增 加,至接种后 5 d 接种鸭全部死亡,病毒 DNA 拷贝

数达最高,约10<sup>11</sup> copies/g(图6)。对照鸭:对照鸭 各个受检样品在不同时段的检测结果都为阴性。 2.5.1 DEV CSC 在接种鸭免疫器官中的动态分布 接种后1~12 h 胸腺、脾脏和法氏囊中病毒 DNA 拷 贝数均在10<sup>5</sup> copies/g的水平上下波动。胸腺中病 毒 DNA 拷贝数于接种后1 d 开始急剧增加,达到 10<sup>8</sup> copies/g,比接种后12 h 约高出2 个数量级,而 脾脏和法氏囊并未有明显变化。接种后 2 d,以上 所有免疫器官中病毒 DNA 拷贝数均迅速增加,其 中胸腺和法氏囊达到 10<sup>9</sup> copies/g,脾脏达到 10<sup>8</sup> copies/g,随后持续增加,5 d 死亡鸭免疫器官中 病毒 DNA 的拷贝数以法氏囊最高,约 10<sup>12</sup> copies/g, 胸腺和脾脏约 10<sup>11</sup> copies/g(图 7)。





12 h 1 d 2 d Time post inoculation

2 d 3 d

4d 5d

2.5.2 DEV CSC 在接种鸭神经组织中的动态分布 接种后 1 h~2 dDNA 拷贝数比较稳定,接种后 3 d 迅速增加,分别达到  $10^6$  copies/g、 $10^{7.8}$  copies/g。接 种后 4 d,大脑和三叉神经神经中病毒 DNA 拷贝数 继续增加,其中大脑上升至  $10^{8.55}$  copies/g,而三叉 神经仍保持在  $10^8$  copies/g 水平,接种后 5 d 接种鸭 死亡,大脑和三叉神经中病毒 DNA 的拷贝数相当, 约  $10^9$  copies/g(图 8)。

2.5.3 DEV CSC 在接种鸭消化道中的动态分布 消化道中病毒 DNA 平均拷贝数在接种后1h~2d无 明显变化。在接种后3d 明显升高,直至接种后5d 接种鸭死亡,消化道中病毒 DNA 达10<sup>11</sup> copies/g 左 右,其中结肠拷贝数最高,约10<sup>13</sup> copies/g,盲肠次之, 约10<sup>12</sup> copies/g。其余组织相当,约10<sup>10.6</sup> copies/g(图9)。



图 8 DEV CSC 强毒株在接种鸭神经组织内的增殖规律



图 9 DEV CSC 强毒株在接种鸭消化道内的增殖规律

2.5.4 DEV CSC 在接种鸭其他实质器官中的动态 分布 在接种后 1~3 h 肺脏呈下降趋势, 而在接种后 3 h~1 d 以上器官中病毒 DNA 拷贝数均保持在 10<sup>5</sup>copies/g的水平。接种后 2 d, 心脏、肺脏和肾脏中 病毒 DNA 拷贝数开始增加接种后 5 d 接种鸭死亡, 心 脏中病毒 DNA 拷贝数最高,约 10<sup>10.65</sup> copies/g, 肺脏和 肾脏分别为 10<sup>9.9</sup> copies/g, 10<sup>9.3</sup> copies/g(图 10)。



图 10 DEV CSC 强毒株在心、肺、肾内的增殖规律

2.5.5 DEV CSC 在接种鸭血清和泄殖腔拭子中的 动态分布 接种后 1 h 血清中病毒 DNA 拷贝数约为  $10^5$  copies/mL,而泄殖腔拭子约为  $10^3$  copies/mL。血 清中病毒 DNA 拷贝数在接种后 1 h~4 d 保持在  $10^4$  copies/mL的水平至接种后 5 d 免疫鸭死亡。而 泄殖腔拭子在接种后 1 h~2 d 整体上保持在  $10^3$  copies/mL的水平并于接种后 3 d 急剧增加,接 种后 5 d 鸭死亡时泄殖腔拭子中病毒 DNA 拷贝数达  $10^{9.8}$  copies/mL(图 11)。



图 11 DEV CSC 强毒株在接种鸭泄殖腔和血清中的增殖规律

### 3 讨论与小结

随着荧光定量 PCR 技术的出现,为研究病毒 在体内的动态分布提供有力的工具。目前常用的 荧光定量 PCR 方法分 TaqMan 探针法和 SYBR Green [ 染料法。齐雪峰<sup>[9]</sup> 和杨晓燕<sup>[10]</sup> 均采用 TagMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 方法分别对 DEV 弱毒 Cha 株和强毒 CHv 株在感染鸭体内的增 值和分布进行了检测,该方法能够精确测定各组织 中的病毒拷贝数,具有很好的敏感性和特异性。然 而 TaqMan 探针法容易受到高度互补序列的影响, 可能出现假阴性的结果,且一般成本较高。SYBR Green I 染料法因为价格低廉,设计简单,也广泛应 用于 DEV 的检测。张新富<sup>[11]</sup>等针对 DEV UL6 基 因设计引物建立了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,对 DEV 疫苗株在 SPF 鸭体内的动态分 布进行了检测,建立的标准曲线可检测到 6.21 个 病毒拷贝。本实验根据 DEV CSC 株 gD 基因上小 片段高度保守的特定序列设计引物,成功建立了特 异性强、敏感性高、重复性好、扩增效率高的检测 DEV CSC SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。

应用已建立的 SYBR Green I 实时荧光定量

PCR 方法对 DEV CSC 强毒株在感染鸭胸腺、脾脏、 法氏囊、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰腺、十二指 肠、回肠、盲肠、结肠、盲肠、大脑、三叉神经节、血清 和泄殖腔拭子中的动态分布进行了检测。DEV 强 毒 CSC 株侵入鸭体后可较早分布干免疫鸭的各个 受检脏器中,证明了 DEV 是一种泛嗜性病毒。接 种后1h、3h、6h、12h、1d 受检样品中病毒 DNA 拷贝数并没有明显变化,表明侵入免疫鸭体内 DEV 强毒 CSC 株并没有迅速增殖。至接种后 3 d. 免疫 鸭各器官中病毒 DNA 拷贝数均明显增加,其中以 脾脏最高,约10<sup>10.52</sup> copies/g,其次是法氏囊、胸腺和 肝脏,分别为10<sup>10.2</sup>、10<sup>9.97</sup>、10<sup>9.91</sup> copies/g.提示感染 鸭的免疫器官和肝脏是 DEV 强毒 CSC 株的主要靶 器官。杨晓燕<sup>[10]</sup>皮下注射 DEV CHv 株 3 d 后,感 染鸭法氏囊和肝脏的检测结果分别为 10<sup>10</sup> copies/g、10<sup>9</sup> copies/g,与本研究结果基本一 致。接种后5d感染鸭死亡,死亡鸭的法氏囊、肝 脏、盲肠、结肠是 DEV 强毒 CSC 株含量较高的组 织, 日各组织中病毒 DNA 拷贝数均明显高于其他 时间点,结合感染鸭往往在出现临床症状后迅速死 亡的特性表明, DEV 强毒 CSC 株在感染鸭死亡前 在各个脏器中有一个迅速增殖的过程,从而加速了 感染鸭的死亡。

感染鸭的免疫器官是 DEV 强毒 CSC 株侵入鸭 体内较早增值分布的靶器官之一,该结果与刘 菲<sup>[12]</sup>、杨晓燕<sup>[10]</sup>等的研究报道相似。有研究<sup>[13-14]</sup> 表明,DEV 的靶细胞为上皮细胞和 B 淋巴细胞,可 引起宿主淋巴细胞萎缩,特别是 T 细胞和 B 细胞大 量减少而引起免疫抑制,而相关病理学研究<sup>[15-16]</sup> 也显示 DEV 会对感染鸭的免疫器官造成严重的病 理损伤。本研究中肌内注射 DEV 强毒 CSC 株后 1 h即可在感染鸭脾脏和法氏囊中检测到病毒 DNA,接种后 6 h 在胸腺中也检测到,提示 DEV 强 毒 CSC 株侵入鸭体内后首先攻击免疫器官,使感染 鸭免疫力下降,为 DEV 强毒 CSC 株在感染鸭全身 各组织中快速增殖以及感染鸭的最终死亡创造了 条件。

本研究中肌内注射 DEV 强毒 CSC 株后 1 h 即 可在大脑中检测病毒 DNA,约 10<sup>5.54</sup> copies/g,而杨 晓燕<sup>[10]</sup>用皮下、口服、滴鼻 3 种途径分别接种 DEV CHv 株的检测结果分别为 10<sup>5.126</sup>、10<sup>5.043</sup>、10<sup>4.491</sup>copies/g,与本研究结果一致。在本研究中法 氏囊和肝脏为病毒 DNA 含量最高的实质器官,分 别为 10<sup>12.11</sup>、10<sup>11.81</sup> copies/g,而杨晓燕<sup>[10]</sup>研究表明 法氏囊和肾脏是病毒 DNA 含量最高的实质器官, 分别为 10<sup>10.094</sup>、10<sup>9.956</sup> copies/g,与其并不完全一致, 这可能与使用的毒株有关。感染鸭血清中病毒 DNA 拷贝数在接种后各时间点均保持在 10<sup>5</sup> copies/g左右,提示感染鸭机体始终存在一定水 平的病毒血症。而泄殖腔拭子中病毒 DNA 拷贝数 在接种后4d比接种后2d高出5个数量级,提示 接种后4d感染鸭体内的排毒量大幅增加,一定程 度上解释了感染鸭在接种后5d迅速死亡的原因。

本研究利用已建立的 SYBR Green I 实时荧光 定量 PCR 方法对 DEV CSC 株在感染鸭体内的动态 分布规律进行了研究,通过比较 DEV CSC 在不同 时间在不同组织中病毒载量差异,为揭示 DEV 致 病机理、研制高效疫苗提供了思路。

#### 参考文献:

- 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.
- Baudet A E R F. Mortality in ducks in the Netherlands caused by a filtrable virus: fowl plague[J]. Tijdschr Diergeneeskd, 1923, 50: 455-459.
- [3] 徐耀基,黄引贤.应用琼脂凝胶沉淀试验检测鹅鸭病料中的 鸭瘟病毒[J].中国畜禽传染病,1992,4:30-31.
- [4] 王红宁,夏定友,廖德惠,等.应用酶联免疫吸附试验检测鸭 瘟病毒的实验研究[J].中国兽医杂志,1989,5(1):43-46.
- [5] 谢芝勋,谢志勤,刘加波,等.用聚合酶链反应检测鸭瘟病毒

的研究[J].中国兽药杂志, 2000, 34(4): 10-12.

- [6] 汤承,索化夷,岳华,等. SYBR Green I 实时定量 PCR 快速 检测鸭瘟病毒的研究[J].中国动物检疫, 2006, 23(9): 25-27.
- [7] FaLong Yang, WenXiang Jia, Hua Yue. Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for duck enteritis virus DNA
   [J]. Avain Disease, 2005, 49(3): 397-400.
- [8] 杨承槐,李俊平,李启红,等.含LacZ表达盒的鸭瘟病毒TK 基因缺失转移载体的构建[J.中国兽药杂志,2013,47(1): 7-9.
- [9] 齐雪峰,程安春,汪铭书,等.应用 TaqMan-MGB 探针 FQ-PCR探讨鸭瘟弱毒苗在鸭体内的分布及排泄规律[J].中 国兽医学报,2008,28(7):766-770.
- [10]杨晓燕,程安春,汪铭书,等.基于TaqMan-MGB 探针实时 荧光定量 PCR 对 DPV 强毒不同途径感染鸭实质器官增殖分 布规律研究[J].中国兽医学报,2008,28(11):223-226.
- [11] 张新富,胡永浩. 鸭瘟病毒疫苗株在免疫 SPF 鸭体内的生长 动力学检测[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(05): 514-518.
- [12] 刘 菲,程安春,汪铭书,等. 鸭瘟病毒强毒株在急性人工感染成年鸭体内分布规律的研究[J]. 中国兽医学报,2004,24
   (3):228-230.
- [13] Shawky S A. Target cells for duck enteritis virus in lymphoid organs[J]. Avian Pathol, 2000, 29(6): 609-616.
- [14] Yuan G P, Cheng A C, Wang M S, et al. Electron microscopic studies of the morphogenesis of duck enteritis virus [J]. Avian Dis, 2005, 49(1): 50-55.
- [15] Proctor S J. Pathogenesis of digestive tract lesions in duck plague[J]. Veterinary Pathology, 1975, 12: 349-361.
- [16] 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.

(编辑:李文平)