

Research Progress on Diagnosis and Prevention of Duck Tembusu Virus Disease

Kaimin Wang^{1*}, Guoqiang Chen^{2*}, Yunfeng Long¹, Jun Luan¹, Lei Chen¹, Yan Jiang¹, Changyin Zhang¹, Taishan Tang¹

¹Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing Jiangsu

²Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou Jiangsu

Email: *wangkm@jsciq.gov.cn, *chengq@jsciq.gov.cn

Received: Jun. 27th, 2018; accepted: Jul. 6th, 2018; published: Jul. 12th, 2018

Abstract

Duck Tembusu virus disease is caused by the Duck Tembusu Virus (DTMUV), which is characterized by retarded growth, rapid egg drop and moderate mortality in ducks and goose flocks. DTMUV infection was first reported in April 2010 in Southeast China, which spread rapidly and resulted in high morbidity rates and acute onset, leading to great economic loss for the duck industry. Based on the data of scholars at home and abroad in recent years, the diagnostic methods and control techniques were reviewed in this paper, in order to provide reference for the prevention and control of the disease.

Keywords

Duck Tembusu Virus, Diagnostic Methods, Vaccine, Control Measures

鸭坦布苏病毒病的检测及防治研究进展

王凯民^{1*}, 陈国强^{2*}, 龙云凤¹, 栾军¹, 陈雷¹, 姜焱¹, 张常印¹, 唐泰山¹

¹江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京

²苏州出入境检验检疫局, 江苏 苏州

Email: *wangkm@jsciq.gov.cn, *chengq@jsciq.gov.cn

收稿日期: 2018年6月27日; 录用日期: 2018年7月6日; 发布日期: 2018年7月12日

摘要

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu Virus, DTMUV)引起鸭、鹅等多种禽类以采食量下

*通讯作者。

文章引用: 王凯民, 陈国强, 龙云凤, 栾军, 陈雷, 姜焱, 张常印, 唐泰山. 鸭坦布苏病毒病的检测及防治研究进展[J]. 亚洲兽医病例研究, 2018, 7(3): 27-35. DOI: 10.12677/acrpvm.2018.73005

降、产蛋下降和伴有一定死淘率为特征的传染病。该病于2010年4月在我国首次暴发,发病急、传播快、发病率高,给鸭养殖户造成了巨大的经济损失。本文结合近年来国内外学者对该病的研究资料,对鸭坦布苏病毒病的实验室检测方法和防控措施研究进展进行了综述,旨在为该病的防治提供参考。

关键词

鸭坦布苏病毒, 诊断方法, 疫苗, 防控措施

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

2010年4月,我国东南沿海地区包括福建、山东、浙江、上海和江苏等地鸭群中突然出现一种以种鸭和蛋鸭产蛋急剧下降为主要特征的传染性疾病,鸭感染后表现为站立不稳,卧地不起等神经症状,病理解剖可见卵泡膜出血、充血和卵泡变形、萎缩以及破裂[1][2]。较短时间内,该病迅速蔓延至我国内陆如河南、安徽等地,据估计2010年全国感染该病的蛋鸭高达12亿只、肉鸭1.5亿只,经济损失达数十亿,给我国禽产业造成了巨大的打击[3][4]。经国内多个研究团队病毒分离与鉴定确认该病的病原为黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)恩塔亚病毒群(Ntaya virus group)中的坦布苏病毒(Tembusu virus),将其命名为鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu virus, DTMUV)[3]。DTMUV的基因组为单股正链RNA,全长约11 kb,共编码3种结构蛋白(囊膜蛋白E、前膜蛋白PrM和衣壳蛋白C)和7种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5)。同其它已知黄病毒一样,DTMUV的E蛋白为病毒主要的抗原蛋白,介导病毒颗粒与宿主细胞受体的结合和促进二者融合,决定了病毒的亲嗜性及毒力,含有多重抗原表位,能诱导机体产生中和抗体[5][6]。

根据鞠明璐[7]对来自7个省份的534个蛋鸭场进行的调查研究结果,鸭坦布苏病毒病传播速度快、发病率高,一般死亡率低,为5%~10%,最高达20%,该病的发病率随着蛋鸭日龄增加而升高,处于产蛋高峰的蛋鸭发病率高达80.5%;鸭坦布苏病毒病的发病呈现明显的季节性,其中9~11月的秋季发病较多,可能与传播该病的节肢动物生活史相关。自2010年DTMUV暴发流行后,研究学者陆续从收集自我国的库蚊[8]、鸭[1]、鹅[9]、鸡[10]、鸽子[11]、麻雀[12]中分离出该病毒,可见其致病范围较广。我国具有悠久的养鸭历史,养鸭业是我国禽产业和畜牧业的重要组成部分,我国是世界上鸭饲养量最大的国家,成年蛋鸭存栏量和肉鸭年出栏量约占世界总量的72%[13][14]。鸭坦布苏病毒病发病急、传染速度快、发病率高、产蛋下降幅度大且难以恢复,自2010年暴发流行以来,已成为严重威胁我国禽产业健康发展的一种重要传染性疾病,因此对该病的准确诊断和有效防治措施开展研究尤为重要。2010年以来,科研工作者对鸭坦布苏病毒病的诊断技术及防治措施进行了大量研究并取得了显著成绩,本文进行综述如下。

2. 诊断方法

2.1. 临床诊断

鸭感染DTMUV后,采食量迅速下降,至少减少50%,产蛋量急剧下降至20%左右,部分病鸭出现体温升高,反应迟钝、排绿色水样粪便;严重者出现神经症状,表现为双腿瘫痪,步态不稳;病鸭零星

死亡,剖检病死鸭的病理变化主要为卵泡充血、出血、萎缩和变性,肺、脾、肝有出血点,肝脏和脾脏肿大,胰腺出血和坏死,输卵管存在大量黏液,部分鸭只盲肠内容物呈现污绿色或黑色,恶臭[15][16][17]。结合临床症状和病理变化可进行初步诊断,但还要依赖于实验室诊断方法进行最终判定。

2.2. 病毒的分离与鉴定

病毒的分离与鉴定是最经典、最准确的病原学检测方法,可分离得到活体病毒,对病毒的深入研究具有重要意义,但是该方法周期长,操作复杂,不适用于快速诊断。感染病鸭的卵巢、脾脏、肝脏和脑等病变组织均可作为分离 DTMUV 的样本,加无菌 PBS 或生理盐水将组织病料充分研磨后经反复冻融、低速离心、过滤除菌步骤后采用尿囊腔接种 9~12 日龄鸭胚或 9~10 日龄 SPF 鸡胚,盲传 1~2 代,收集尿囊液接种鸭胚成纤维细胞培养,可分离得到 DTMUV [18][19][20]。曹宗喜[18]等从某鸭场的疑似鸭坦布苏病病死鸭中分离到 1 株病毒,并对该毒株进行 PCR 鉴定和序列分析,结果显示,分离株的序列与 GenBank 上登录的 DTMUV 序列的同源性在 99%以上。李方韬[19]等人从山东省某种鸭场送检的鸭胚中分离到一株 DTMUV, SDBZ 株,该病毒可引起鸭胚组织器官病变,致胚胎死亡并呈现出血性水肿。王宾宾[20]等人从 2015 年采集自浙江鸭养殖场的病鸭卵巢病料分离得到 2 株 DTMUV,经全基因组测序后进行比对分析,与 GenBank 中的 19 株 DTMUV 参考序列相比,在核苷酸水平和 E 蛋白氨基酸水平上,其同源性分别大于 97.1%和 98.4%。

2.3. 分子生物学检测方法

分子生物学检测技术主要有逆转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR),套氏 RT-PCR,实时荧光定量 PCR 和逆转录环介导等温扩增技术(RT Loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)等,因具有快速、灵敏及特异性强等优点,已成为实验室常用的病原学检测手段。

2.3.1. 常规 RT-PCR

目前对于 DTMUV 的常规 RT-PCR 方法,主要是针对 E 蛋白及非结构蛋白 NS1、NS3 及 NS5 等基因保守区域设计特异性引物建立的 RT-PCR 方法。万春和等[21]根据黄病毒 NS5 蛋白编码区的保守区域设计特异性引物,建立了检测 DTMUV 的 RT-PCR 方法,该方法具有良好的特异性,最低可检测到 20 pg 的病毒核酸。王建昌等[22]针对 DTMUV 的 E 蛋白编码区保守区域设计引物,建立了一步法 RT-PCR,该方法最低可以检测到 103 拷贝/ μL 的 DTMUV 核酸。

2.3.2. 套式 RT-PCR

为提高检测的特异性和敏感性,有学者在 RT-PCR 方法的基础上建立了套氏 RT-PCR,如在 E 蛋白编码区设计两对特异性引物,通过两次 PCR 扩增获得 DTMUV 特异性片段,敏感性比普通 RT-PCR 方法提高了 10 倍[23]。

2.3.3. 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 是一种敏感性高、特异性强,并能对检测样品进行定量分析的 PCR 方法。李庆阳等[24]针对 DTMUV 保守基因片段设计特异性引物和 Taq Man 探针,建立的 DTMUV 实时荧光定量 PCR,比常规 PCR 方法敏感性提高了至少 100 倍,可用于 DTMUV 的检测和定量分析。刘洋等[25]采用 TaqMan 荧光标记探针技术,针对 DTMUV JXSP 株的保守囊膜蛋白 E 基因建立了快速检测 DTMUV 的实时荧光 RT-PCR 方法,试验证实该方法不会对禽流感病毒、新城疫病毒、鸭瘟病毒等 11 种家禽流行病病毒发生非特异性扩增,灵敏度可达 20 拷贝/反应,可用于 DTMUV 的快速诊断和大规模检测。Yan 等[26]建立的 DTMUV E 蛋白基因特异性的 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR,敏感性是常规 RT-PCR 的 100 倍。

2.3.4. RT-LAMP 方法

LAMP 是由 Notomi 等[27]建立的一种新型核酸扩增技术,其工作原理是针对目的基因六个区域设计四条引物,通过链置换 Bst DNA 聚合酶在恒温条件下短时间内实现指数级的扩增,可通过肉眼观察判定结果,具有高特异性和高灵敏度。Wang 等[28]针对 DTMUV E 基因保守区域设计了一套特异性引物,建立的 RT-LAMP 检测方法敏感度比常规 RT-PCR 高,检测限为 2 拷贝/ μL 。吴植等[29]根据 GenBank 中公布的 DTMUV E 蛋白基因高度保守区设计了一套引物,通过优化反应体系各组分浓度、反应时间和温度,建立了一种灵敏、便捷的 RT-LAMP 扩增方法,试验结果显示该方法的灵敏度是常规 RT-PCR 的 100 倍。该方法虽然在检测敏感性上不如荧光定量 PCR,但所需检测设备简单,特异性好,试验周期短,更适合野外现场和实验条件有限的基层机构使用。董嘉文[30]等针对 DTMUV E 基因保守区域设计 LAMP 引物,结合实时荧光技术建立了 DTMUV 特异性的实时荧光 RT-LAMP 检测方法,该方法在反应前加入饱和荧光染料 SYTO-9,在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中进行反应,荧光信号的累积与 LAMP 产物形成同步进行,只需根据扩增曲线判定结果,灵敏度是传统 RT-PCR 方法的 100 倍,因且不易形成气溶胶污染,有效避免了假阳性问题,满足疾病准确诊断要求。张伟等[31]针对 DTMUV E 基因保守区域设计引物建立了 DTMUV RT-LAMP 检测体系,并对比使用荧光染色剂 SYBR Green I 和钙黄绿素、锰离子对扩增产物的可视化判定,SYBR Green I 的显色敏感性为 10 拷贝/ μL ,钙黄绿素和锰离子组合显色极限为 1000 拷贝/ μL ,敏感性较 SYBR Green I 低,但其能有效避免交叉污染且操作简便,适用于条件相对落后的基层实验室检测。

2.3.5. 多重 RT-PCR 检测方法

多重 PCR 能够同时检测和鉴别多种病原,在多种病原混合感染可能时的鉴别诊断中具有快速、便捷等优势,临床应用价值高。孙敏华等[32]建立了一种能够同时检测引起家禽产蛋下降的鸭坦布苏病毒、H9 亚型禽流感病毒、产蛋下降综合征病毒三种病原的荧光定量 PCR 检测方法,经过对临床样品的检测结果说明三重荧光 PCR 方法比常规 PCR 敏感性高。李海琴[33]等建立了同时检测 H5、H9 亚型禽流感病毒和 DTMUV 的三重 PCR 检测方法,对临床 200 份样品的检测结果证明该方法快速、敏感、特异性强,适用于临床检测应用。张艳芳[34]等根据 DTMUV E 基因和鸭瘟病毒(DPV)UL6 基因保守区域设计引物建立同时检测两种病毒的 RT-PCR 方法,特异性良好,不与鸭新城疫病毒、鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒、H9 亚型禽流感病毒发生非特异性反应,能同时检出 500 fg 的 DTMUV 和 600 fg 的 DPV,敏感性高,满足临床检测要求。

2.4. 血清学检测方法

2.4.1. 酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA 检测方法具有快速、高通量、敏感性高、特异性强等优点,已成为 DTMUV 血清学诊断的常用方法。王善辉等[35]利用杆状病毒表达系统,将 DTMUV E 蛋白基因在昆虫细胞中表达以获得更接近天然构型且能最大限度保留抗原表位的重组蛋白,并以该重组蛋白建立了 DTMUV 抗体特异性检测的间接 ELISA 方法,同时使用全病毒作为包被抗原的间接 ELISA 检测方法对来自江苏的 135 份樱桃谷鸭血清样品进行检测,两者符合率为 93.1%。傅秋玲[36]等截短表达 DTMUV E 蛋白的主要优势抗原表位 E1 蛋白并以此为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法,对来自福建省的 237 份麻鸭血清样品进行初步应用,通过与以全病毒作为包被抗原的间接 ELISA 检测方法比较,两者符合率为 95.1%,可用于监测我国鸭坦布苏病毒疫苗的免疫效果。中国农业科学院上海兽医研究所科研人员建立的间接 ELISA 血清学检测方法简便快速,易于标准化,适于大规模样品的初步筛查[37]。瑞普(保定)生物药业有限公司与中国农业科学院上海兽医研究所合作对该方法进一步优化并实现了生产转化,研制了 DTMUV 间接 ELISA 抗体检测试剂盒,

初步应用试验结果表明,该试剂盒特异性好、敏感性高,可以检测到 DTMUV 感染后 3 d 的鸭血清 DTMUV 抗体转阳。在对 300 份临床样品的检测中,该检测试剂盒与中和试验总符合率为 94.0% [38]。

黄病毒属中各个病毒 E 蛋白具有相似性,因此各个病毒血清存在一定交叉反应性,利用 DTMUV E 蛋白或纯化的灭活病毒作为包被抗原建立的 ELISA 血清学检测方法均存在黄病毒阳性血清交叉问题,为鸭坦布苏病毒病的确诊造成了困难[39] [40]。李晨曦[41]等人以纯化的单克隆抗体 1A5 为筛选分子,采用噬菌体展示技术鉴定 DTMUV E 蛋白的特异性抗原表位,再利用 DNASTar 软件分析该表位序列在 DTMUV 中的保守性以及同其它黄病毒 E 蛋白相应位点的氨基酸序列相似性,成功筛选出 DTMUV E 蛋白的一个高度保守的线性抗原表位 87YAEYI91,利用该表位建立 Epitope-ELISA 血清学检测方法,同时使用中和试验作为标准通过对 126 份鸭血清样品进行检测对比,结果证实 Epitope-ELISA 检测方法相对特异性为 100%,相对敏感度为 96%,但在该方法中反应的亲和力有待进一步提高。Chen 等[42]以 2 种 DTMUV E 蛋白特异性单克隆抗体建立了双抗夹心 ELISA(DAS-ELISA)检测方法,不与鸭瘟病毒、H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒、鸭 1 型肝炎病毒、鸭呼肠孤病毒发生非特异性反应,同时采用 RT-PCR 方法检测 191 份临床样本,二者符合度 85.8%。

2.4.2. 乳胶凝集试验

乳胶凝集试验(LAT)操作简便、不需要特殊仪器设备,可在 1~5 min 内肉眼观察结果,已广泛用于畜禽传染病的血清学检测。万春和[43]等以浓缩纯化的 DTMUV 为检测抗原,通过与特异性 DTMUV 阳性血清反应后出现肉眼可见的凝集颗粒而建立了 DTMUV 抗体乳胶凝集检测方法,经试验证实该方法具有良好的特异性;同时采用间接 ELISA 方法对 80 份鸭血清进行检测,二者符合率为 85.3%,因乳胶凝集试验简便、快速、特异等优点,可用于临床样品的快速诊断。

3. 防治措施

3.1. 灭活疫苗

病毒灭活疫苗主要是采用甲醛、 β -丙内酯(BPL)等灭活剂对病毒培养液进行灭活处理后,加入适宜的佐剂进行乳化制备而成。灭活疫苗具有良好的安全性和稳定性,应用广泛。高旭远[44]等使用 DTMUV 弱毒株(FX2010-180P)作为种毒,选用甲醛和 BPL 两种灭活剂灭活后,与佐剂 Montanide ISA 50V2 乳化后形成油包水型灭活疫苗,免疫效力评价试验结果说明抗原含量高低影响着免疫效力,抗原含量高,则诱导产生抗体时间较早,抗体滴度也较高;试验结果还提示 BPL 灭活的疫苗组免疫效力更好,对鸭保护率高达 100%。张聪[45]等人制备的重组融合肽 Ta1-BP5(胸腺肽 $\alpha 1$ 和法氏囊活性肽 BP5 的融合肽)与 DTMUV 灭活疫苗联合使用同单独使用疫苗或单肽+疫苗进行比较,机体体液免疫水平、细胞免疫水平和肝保护效果明显增强,说明重组融合肽 Ta1-BP5 具有良好的免疫佐剂效果。有学者对北京市农林科学院畜牧兽医研究所和瑞普生物药业有限公司研制的鸭坦布苏病毒灭活疫苗(HB 株)进行了系列研究:韩春华[46]等用该灭活疫苗对开产前的樱桃谷肉鸭种鸭进行免疫,再将种鸭产的种蛋进行孵化,最后通过抗体检测和攻毒保护试验来研究雏鸭的母源抗体效价和消长动态,研究结果说明该灭活苗母源抗体能够保护 10 日龄内雏鸭,疫苗首免时间在 7~10 日龄最佳。段会娟[47]等主要探索了该疫苗对北京鸭的免疫产生期和持续期,并评价和比较了不同接种途径的保护效力,研究结果证实该灭活苗对 16 日龄北京鸭进行二次免疫后 7 天可测到血清抗体阳性并产生良好的保护效果,皮下注射和胸部肌肉注射途径的免疫持续期分别为 60 天和 100 天,说明胸部肌肉注射途径更佳。何平有[48]等对 5 个批次 GMP 车间生产的鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)的安全性和效力进行了临床评价,采用双倍剂量免疫樱桃谷鸭、北京鸭雏鸭和产蛋北京鸭,均没有出现明显免疫副作用;免疫后 14 天血清抗体出现转阳,转阳率在 40%~80%,免疫 28~135

天, 转阳率超过 90%, 免疫后 28 天和 135 天的攻毒血清病毒分离率和卵巢病变率减少 80% 以上, 说明该灭活苗具有良好保护效果, 可用于临床防治。该疫苗已于 2016 年获得国家新兽药证书。

3.2. 弱毒活疫苗

于可响等[49]将鸭坦布苏病毒山东分离株 BZ_2010 在 SPF 鸡胚上进行连续传代致弱, 传代过程中毒价逐渐升高, 实验证实经过 120 次传代培养的 VC2 毒株对 1 日龄雏鸭和 30 周龄产蛋种鸭已完全丧失了致病力, 毒力返强试验中 5 代内未出现任何返强迹象; 接种免疫后, 鸭体内抗体水平上升快, 维持时间长、衰减缓慢, 基本可以维持整个产蛋期。在病毒滴度 $5.5\lg\text{TCID}_{50}$ 时不能在鸡胚中增殖, 且不能感染小鼠和麻鸭。Guoxin Li 等[50]将 DTMUV 强毒株 FX2010 在鸡胚成纤维细胞中连续传代 180 次, 获得一株减毒株 FX2010-180P, 以 $5.5\log_{10}\text{TCID}_{50}$ 剂量感染鸭不会出现临床症状和任何病理损伤; 在低剂量 $3.5\log_{10}\text{TCID}_{50}$ 条件下能诱导机体产生有效免疫反应并在攻毒试验中表现出完全保护作用; 对减毒机制研究发现, FX2010-180P 毒株出现了 19 个氨基酸改变和 15 个同义突变位点, 其中非结构蛋白 NS1、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5 发生的 10 个突变位点出现在较高代次病毒, 正好是病毒失去体内增殖能力的时间点。E 蛋白第 120、312、349 位和 NS1-262、NS3-322 氨基酸改变发生在在第 60 代, 推测可能与病毒的神经毒性和神经侵染性相关, 因为突变后的病毒没有出现在感染鸭的脑组织中。吴晓刚[51]等对减毒疫苗株 FX2010-180P 毒种低温保存进行了研究, -80°C 低温保存 16 个月后, 病毒滴度没有明显下降, 免疫原性保存良好, 毒种增殖病毒以 101.5TCID_{50} 剂量接种仍然可以为 90% 的接种鸭提供保护。韩建文[52]等将鸭瘟鸡胚化弱毒活疫苗与鸭坦布苏病毒弱毒活疫苗(FX2010-180P 株)联合使用, 肌肉注射途径接种 21 日龄健康肉鸭, 没有出现不良副反应, 血清抗体检测结果证实两种疫苗联合使用所产生的抗体水平高于单独免疫。齐鲁动物保健品有限公司研制成的 DTMUV WF100 株弱毒活疫苗, 已于 2016 年获得国家新兽药证书。

3.3. 基因工程疫苗

Chen 等[53]以减毒活疫苗的鸭肝炎病毒(DEV)为载体, 分别构建了表达 DTMUV 囊膜蛋白的重组病毒 rDEV-TE 以及同时表达 DTMUV 囊膜蛋白和前膜蛋白的重组病毒 rDEV-PrM/TE, 动物实验证实这两种重组病毒均能引起鸭产生 DTMUV 中和抗体, 攻毒试验中 rDEV-PrM/TE 组保护率为 100%。邹忠等[54]以鸭肠炎病毒为载体, 运用 CRISPR/Cas 系统将禽流感病毒 H5N1 的主要免疫原性基因 HA 和 DTMUV 的 E 蛋白基因、PrM 基因插入鸭肠炎病毒的基因间隙, 构建鸭肠炎病毒-鸭禽流感-鸭坦布苏病毒基因工程三价疫苗, 为鸭的这三种疾病预防提供了有利武器。

3.4. 卵黄抗体的制备与应用

卵黄抗体是一种广泛应用于家禽、家畜以及人类疾病诊断和防治方面生物制剂, 对病毒性疾病治疗有独特优势[55]。胡紫霞[56]鸭坦布苏病毒 AH-F10 株灭活病毒免疫高产蛋鸡, 制备抗鸭坦布苏病毒高免卵黄抗体, 经过人工攻毒试验证实卵黄抗体对鸭坦布苏病毒病具有良好的预防和治疗作用。赵瑞宏等[57]使用 AH01 株 DTMUV 作为抗原 3 次免疫产蛋母鸡, 收集鸡胚后制备出高免卵黄抗体, 具有良好的安全性, 对 DTMUV 具有明显的中和作用, 能有效保护鸡胚、雏鸭和产蛋鸭。王领兄等[58]制备的 DTMUV 特异性高免卵黄抗体, 琼脂扩散试验抗体效价为 1:64, 对 DTMUV 强毒株攻毒保护率达 100%。卵黄抗体制备成本低、产量高、安全有效, 可广泛运用于 DTMUV 的防治。

3.5. 药物研究

对于该病, 目前尚无特效治疗药物, 通常在发病早期采用 DTMUV 卵黄抗体、康复鸭血清或高免血

清进行紧急预防或治疗。陆新浩等[59]对 5 种常用的抗病毒药物(金刚乙胺、脱氧若卡素钠、病毒灵、利巴韦林、阿昔洛韦)进行体外抗鸭坦布苏病毒的药物筛选试验,结果表明利巴韦林在体外对鸭坦布苏病毒具有抗病毒作用,而其余 4 种药物对该病毒无明显抗病毒作用。

4. 结语

自 2010 年以来,DTMUV 的流行成为了困扰我国禽养殖业发展的一大难题,因该病毒传播迅速、发病率高,种鸭、蛋鸭感染后产蛋量下降幅度大,恢复难,经济损失惨重。目前,对 DTMUV 的研究还有很多问题有待解决,首先,进一步开展 DTMUV 的分子流行病学调查是研究该病毒的重点工作之一,这对追溯该病毒的起源与进化具有重要意义。其次,应加快对该病的传播途径方面的研究,以便实施有效的预防措施。最后,对于 DTMUV 的基因功能、遗传变异和致病性等方面的研究能揭示病毒在传播过程中的突变及毒力变化、病毒与宿主细胞之间的相互作用等机制,将有助于研制出特异性的治疗药物和疫苗。

基金项目

2016 年国家质检总局科技计划项目 2016IK132。

参考文献

- [1] Su, J., Li, S., Hu, X., *et al.* (2011) Duck Egg-Drop Syndrome Caused by BYD Virus, a New Tembusu-Related Flavivirus. *PLoS ONE*, **6**, e18106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018106>
- [2] Cao, Z., Zhang, C., Liu, Y., *et al.* (2011) Tembusu Virus in Ducks, China. *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 1873-1875. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101890>
- [3] Yan, P., Zhao, Y., Zhang, X., *et al.* (2011) An Infectious Disease of Ducks Caused by a Newly Emerged Tembusu Virus Strain in Mainland China. *Virology*, **417**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.003>
- [4] Lei, W., Guo, X., Fu, S., Feng, Y., *et al.* (2017) The Genetic Characteristics and Evolution of Tembusuvirus. *Veterinary Microbiology*, **201**, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.003>
- [5] Yu, K., Sheng, Z., Huang, B., *et al.* (2013) Structural, Antigenic and Evolutionary Characterizations of the Envelope Protein of Newly Emerging Duck Tembusu Virus. *PLoS ONE*, **8**, e71319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071319>
- [6] Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2003) Molecular Biology of Flaviviruses. *Advances in Virus Research*, **59**, 23-61. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59002-9)
- [7] 鞠明璐. 蛋鸭坦布苏病毒流行现状及防控[J]. 中国畜牧业, 2017(3): 77-78.
- [8] Tang, Y., Diao, Y., Chen, H., *et al.* (2015) Isolation and Genetic Characterization of a Tembusu Virus Strain Isolated from Mosquitoes in Shandong, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 209-216. <https://doi.org/10.1111/tbed.12111>
- [9] Huang, X., Han, K., Zhao, D., *et al.* (2013) Identification and Molecular Characterization of a Novel Flavivirus Isolated from Geese in China. *Research in Veterinary Science*, **94**, 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.014>
- [10] Liu, M., Chen, S., Chen, Y., *et al.* (2012) Adapted Tembusu-Like Virus in Chickens and Geese in China. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 2807-2809. <https://doi.org/10.1128/JCM.00655-12>
- [11] Liu, P., Lu, H., Li, S., *et al.* (2012) Genomic and Antigenic Characterization of the Newly Emerging Chinese Duck Egg-Drop Syndrome Flavivirus: Genomic Comparison with Tembusu and Sitiawan Viruses. *Journal of General Virology*, **93**, 2158-2170. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043554-0>
- [12] Tang, Y., Diao, Y., Yu, C., *et al.* (2013) Characterization of a Tembusu Virus Isolated from Naturally Infected House Sparrows (*Passer domesticus*) in Northern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, **60**, 152-158. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01328.x>
- [13] 曹振山, 王士荣, 汪洋. 浅谈养鸭业的现状[J]. 畜禽业, 2017, 28(z1): 56.
- [14] 黄瑜, 卢立志, 傅光华, 等. 当前我国南方养鸭生产中存在的问题与疫病防控措施[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(8): 98-102.

- [15] 刘强, 顾海丰. 一例蛋鸭黄病毒病的诊治[J]. 湖北畜牧兽医, 2015, 36(3): 29.
- [16] 刘波, 刘娜, 孔令静, 等. 一例蛋鸭黄病毒病诊治[J]. 中国畜禽种业, 2017, 13(6): 150-152.
- [17] 江敏生, 陈盛絮. 一例鸭坦布苏病的诊治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(2): 231.
- [18] 曹宗喜, 贺冬梅, 叶保国, 等. 鸭坦布苏病毒的分离和 PCR 鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 152-153.
- [19] 李芳韬, 江蕾, 王雪梅, 等. 鸭胚中鸭坦布苏病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽, 2015, 37(24): 63-65.
- [20] 王宾宾, 闫大为, 倪欣涛, 等. 鸭坦布苏病毒分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(6): 8-14.
- [21] 万春和, 施少华, 程飞龙, 等. 鸭出血性卵巢炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2011, 26(1): 10-12.
- [22] 王建昌, 王金凤, 袁万哲, 等. 鸭坦布苏病毒一步法 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(8): 629-633.
- [23] 颜丕熙, 李建新, 吴晓刚, 等. 应用套氏 RT-PCR 快速检测鸭坦布苏病毒[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 48(3): 34-37.
- [24] 李庆阳, 陈芳艳, 刘平, 等. 鸭坦布苏病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(7): 18-22.
- [25] 刘洋, 霍斯琪, 王传彬, 等. 实时荧光定量 TaqMan RT-PCR 检测鸭坦布苏病毒方法的建立及初步应用[J]. 中国家禽, 2017, 39(20): 23-26.
- [26] Yan, L., Yan, P., Zhou, J., *et al.* (2011) Establishing a TaqMan-Based Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Quantification of the Newly Emerged Duck Tembusu Virus. *Virology Journal*, **8**, 464-470. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-464>
- [27] Notomi, T.H. Okayama, H., Masubuchi, T., *et al.* (2000) Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**, E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- [28] Wang, Y., Yuan, X., Li, Y., *et al.* (2011) Rapid Detection of Newly Isolated Tembusu-Related Flavivirus by Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification Assay. *Virology Journal*, **8**, 553-559. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-553>
- [29] 吴植, 夏文龙, 蔡树东, 等. 鸭坦布苏病毒可视化 RT-LAMP 快速检测方法的建立与初步应用[J]. 中国畜牧兽, 2017, 44(11): 3334-3339.
- [30] 董嘉文, 孙敏华, 李林林, 等. 实时荧光技术在鸭坦布苏病毒 RT-LAMP 检测方法中的应用[J]. 广东农业科学, 2015, 42(1): 109-112.
- [31] 张伟, 逯茂洋, 黄庆华, 等. 荧光显色技术在鸭坦布苏病毒 LAMP 检测方法中的应用及比较[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(4): 406-411.
- [32] 孙敏华, 李林林, 董嘉文, 等. 鸭坦布苏病毒、产蛋下降综合征病毒和 H9 亚型禽流感病毒三重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2017, 42(4): 37-42.
- [33] 李海琴, 傅光华, 黄瑜, 等. H5、H9 亚型禽流感病毒及鸭坦布苏病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 福建农业学报, 2015, 30(8): 727-730.
- [34] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒与鸭瘟病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 南方农业学报, 2014, 45(2): 314-317.
- [35] 王善辉, 谢金文, 强成魁, 等. 鸭坦布苏病毒 E 基因重组杆状病毒的构建与间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国家禽, 2016, 38(1): 21-24.
- [36] 傅秋玲, 陈珍, 施少华, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白包被抗原间接 ELISA 方法的建立[J]. 福建农业学报, 2015, 30(1): 1-5.
- [37] 姬希文, 闫丽萍, 颜丕熙, 等. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(8): 630-634.
- [38] 张德宝, 李雪松, 郁宏伟, 等. 鸭坦布苏病毒间接 ELISA 抗体检测试剂盒的初步应用[J]. 中国家禽, 2017, 39(19): 22-26.
- [39] Yin, X., Lv, R., Chen, X., *et al.* (2013) Detection of Specific Antibodies against Tembusu Virus in Ducks by Use of an E Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**, 2400-2402. <https://doi.org/10.1128/JCM.00361-13>
- [40] Luo, Y., Feng, J., Zhou, J., *et al.* (2013) Identification of a Novel Infection-Enhancing Epiropeon Dengue prM Using a

Dengue Cross-Reacting Monoclonal Antibody. *BMC Microbiology*, **13**, 194.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-194>

- [41] 李晨曦, 白小飞, 邵周伍林, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白特异性抗原表位鉴定及 Epitope-ELISA 血清学诊断方法建立[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(10): 1958-1968.
- [42] Chen, H., Ou, Q., Tang, Y., *et al.* (2014) Development and Evaluation of a DAS-ELISA for Rapid Detection of Tembusu Virus Using Monoclonal Antibodies against the Envelope Protein. *PLoS ONE*, **9**, e96366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096366>
- [43] 万春和, 傅秋玲, 陈珍, 等. 乳胶凝集试验方法在检测鸭坦布苏病毒抗体中的应用[J]. 福建农业学报, 2013, 28(12): 1200-1203.
- [44] 高旭元. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗的研制[D]: [硕士学位论文]. 晋中: 山西农业大学, 2014.
- [45] 张聪, 张巫凡, 周江飞, 等. 重组免疫融合肽 Ta1-BP5 对鸭坦布苏病毒灭活疫苗的免疫增强作用[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(8): 945-950.
- [46] 韩春华, 赵际成, 段会娟, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)母源抗体的消长规律[J]. 中国农业科学, 2016, 49(14): 2837-2843.
- [47] 段会娟, 林健, 杨志远, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)免疫产生期和持续期的试验[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(6): 106-108.
- [48] 何平有, 郁宏伟, 吴雅清, 等. 鸭坦布苏病毒病灭活疫苗(HB 株)安全和效力的临床评价[J]. 中国动物保健, 2018(1): 48-51.
- [49] 于可响, 马秀丽, 袁小远, 等. 鸭坦布苏病毒鸡胚弱毒株的选育[J]. 中国农业科学, 2016, 49(14): 2822-2829.
- [50] Li, G.X., Gao, X.Y., Xiao, Y.L., *et al.* (2014) Development of a Live Attenuated Vaccine Candidate against Duck Tembusu Viral Disease. *Virology*, **450-451**, 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.028>
- [51] 吴晓刚, 高旭元, 余磊, 等. 鸭坦布苏病毒病活疫苗(FX2010-180P 株)毒种保存期的研究[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 2(3): 14-18.
- [52] 韩建文, 申茂欣, 蔡联棠, 等. 鸭瘟与鸭坦布苏病毒病活疫苗联合免疫效果研究[J]. 水禽世界, 2016(2): 37-42.
- [53] Chen, P.C., Liu, J.X., Jiang, Y.P., *et al.* (2014) The Vaccine Efficacy of Recombinant Duck Enteritis Virus Expressing Secreted E with or without PrM Proteins of Duck Tembusuvirus. *Vaccine*, **32**, 5271-5277. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.082>
- [54] Zou, Z., Huang, K., Wei, Y., *et al.* (2017) Construction of a Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Duck Enteritis Virus-Based Vaccine against H5N1 Avian Influenza Virus and Duck Tembusu Virus Infection. *Scientific Reports*, **7**, 1478. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01554-1>
- [55] Yegani, M., Korver, D.R., 洪胜辉, 张宜辉. 卵黄抗体作为抗生素替代品在家禽生产中的应用[J]. 中国家禽, 2010, 32(13): 1-4.
- [56] 胡紫霞, 王汉清, 王立, 等. 抗鸭坦布苏病毒卵黄抗体的制备及应用试验[J]. 疫病防治, 2013, 30(7): 49-51.
- [57] 王领兄, 张婕. 鸭坦布苏病毒高免卵黄抗体的制备及免疫攻毒保护试验[J]. 中国动物保健, 2014, 16(7): 18-20.
- [58] 赵瑞宏, 张丹俊, 潘孝成, 等. 抗鸭坦布苏病毒卵黄抗体的制备及检测[J]. 养禽与禽病防治, 2014(1): 12-14.
- [59] 陆新浩, 刘鸿, 任祖伊. 体外抗鸭坦布苏病毒的药物筛选试验[J]. 浙江畜牧兽医, 2017, 42(4): 5-8.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8880, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acrpvm@hanspub.org