

建立鴨腸炎病毒之聚合酶鏈反應與即時聚合酶鏈反應檢測方法

陳燕萍*、李璠、邱垂章

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 鴨腸炎病毒是鴨病毒性腸炎的病原，可造成水禽發生急性、傳染性和致死性的疾病。本研究建立高敏感性與特異性的鴨腸炎病毒的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 與即時 PCR 檢測方法。其中，PCR 的檢測極限為 100 拷貝數，而即時 PCR 的檢測極限為 10 拷貝數，且即時 PCR 方法中之標準核酸的對數值與 crossing point 值具線性相關，其線性相關性 (R^2) 達 0.9992。特異性部分，無論是 PCR 或是即時 PCR 皆僅鴨腸炎病毒核酸呈陽性反應，其餘水禽常見病原之核酸檢測結果皆為陰性。利用 PCR 進行 2006 年至 2021 年計 229 場次水禽病例與 43 批次進口水禽檢疫案件之鴨腸炎病毒檢測，結果皆為陰性。未來的水禽檢體將利用已建立的 PCR 與即時 PCR 平行檢測，以提升鴨病毒性腸炎診斷的敏感性。

關鍵詞：鴨腸炎病毒、鴨病毒性腸炎、聚合酶鏈反應、即時聚合酶鏈反應、檢疫

緒言

鴨病毒性腸炎 (duck virus enteritis, DVE) 又稱鴨瘟 (duck plague)，是一種急性、傳染性和致死性的水禽疾病，可造成水禽產業重大的經濟損失。目前，在畜養或野生水禽曾報導過此病的國家包括荷蘭、美國、中國、法國、比利時、印度、泰國、英國、加拿大、匈牙利、丹麥、奧地利、越南、德國、孟加拉國、埃及和波蘭 [4, 12]。

鴨瘟的病原是 *Anatid alphaherpesvirus 1* 或稱為鴨腸炎病毒 (duck enteritis virus, DEV)，屬於 *Herpesviridae* 科、*Alphaherpesvirinae* 亞科和 *Mardivirus* 屬的成員 [8]。DEV 具封套，病毒顆粒的直徑約為 126~129 nm [12]，其基因體為線性雙股 DNA，長度約為 158 kbp，可轉譯成 78 種蛋白質 [10]。DEV 的基因體包括四個區域：獨特的長區域 (unique long region, UL region)、獨特的短區域 (unique short region)、獨特的短內部重複區域 (unique short internal repeat region) 和獨特的短末端重複

區域 (unique short internal repeat region)。在這些區域中，UL 區域的基因具較高的保守度，因此，許多文獻於 UL 區域擴增基因以進行分子檢測 [3, 9]。

鴨、鵝和天鵝等雁形目鴨科是 DEV 的天然宿主 [2]，DEV 可透過直接接觸、間接接觸或垂直感染而傳播，候鳥與感染過復原的水禽可為 DEV 的帶原者 [1]，感染後恢復的水禽具再感染 DEV 的抗性 [15]。雖然不同的 DEV 在毒力上可能有差異，但都有相同的抗原性 [12, 13]。所有年齡水禽皆可感染 DEV，但年長水禽對本病毒較具感受性 [2, 12]。

在家鴨中，DVE 的潛伏期為 3~7 天，成熟鴨隻感染 DEV 最初可見猝死，大量和持續性死亡，此外，臨床症狀還包括虛弱、沉鬱、畏光、煩渴、食慾不振、共濟失調、流鼻涕、水樣腹瀉、羽毛雜亂和肛門髒污，在產蛋水禽，產蛋量可能明顯下降 [4, 12, 15]。死亡通常發生於臨床症狀出現後 1~5 天，死亡率可能在 5~100%，取決於受感染水禽的品種、免疫狀態、年齡和性別以及病毒的毒力 [4, 12, 15]。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

DVE 的肉眼病變主要是血管損傷伴隨各組織臟器出血，包括腸道、體腔、心臟、心包囊、肝臟、脾臟等，以及於淋巴與實質器官出現壞死性退行性變化。由口腔至泄殖腔可發現特徵的消化道黏膜病變，一開始為黃斑表面出血 (macular surface hemorrhage)，隨著病程發展而演變為黃白色的硬皮斑塊 (crusty plaques)，最後為綠色的表面結痂 (superficial scabs)，病灶也可能合併形成大的、斑片狀的白喉膜。於幼鴨，淋巴組織的病變較出血病變明顯 [4, 12, 15]。

DVE 的初步診斷可根據病史、臨床症狀以及肉眼和組織病理學病變判定，依據世界動物衛生組織 (WOAH) 建議，可利用病毒的分離和鑑定、傳統的聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 與即時 PCR (real-time PCR) 進行 DVE 確診 [5, 6, 11, 15, 16, 17, 18, 19]。

DVE 在我國屬於丙類動物傳染病，亦是輸入動物傳染病監測項目之一，依據 2006 年 4 月 27 日動植物防疫檢疫局 (防檢局) 召開研商輸入動物傳染病監測項目與檢測方法等事宜會議紀錄，輸入水禽之 DEV 檢測方法由原先之血清中和抗體試驗修訂為以 PCR 檢測抗原核酸，本報告即為描述 DEV 的 PCR 與即時 PCR 檢測方法的建立，以及 DEV PCR 建立後的應用情形。

材料與方法

病毒

本研究所使用的 DEV 為 Holland B 株 (疫苗毒)，為於 2003 年購自美國農業部動植物衛生檢驗服務局獸醫服務部門的國家獸醫服務實驗室 (United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories; USDA, APHIS, VS, NVSL)，防檢局核發之輸入許可證號為 0921411833。

核酸萃取

DEV、水禽其他常見病原與待測檢體以 QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) 或 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 依廠商提供之說明書進行核酸萃取。

引子與探針

PCR 使用之引子為 WOA 建議之 number 7 (7F, 5'-GAAGGCGGGTATGTAATGTA-3' 與 7R, 5'-CAAGGCTCTATTTCGGTAATG-3')，預計 PCR 產物大小為 446 bp [6, 15]。

即時 PCR 使用之引子與探針亦為依據 WOA 建議，引子為 5'-CTCTACGCAGCTTTTGACGATTT-3' 與 5'-AGAAACATACTGTGAGAGTGACGA-3'，探針為 6FAM-CCTCCTCCTCGCTGAGTGGCATCC-BHQ1，預期產物大小為 124 bp [15, 17]。

標準核酸的製備

以上述 PCR 與即時 PCR 使用之引子分別利用 PCR 增幅產生 446 bp 和 124 bp 的核酸片段，並依據廠商提供之操作手冊進行核酸純化、選殖與增幅，以獲得標準核酸 (DNA)。使用 QIAGEN PCR Purification kit (QIAGEN) 純化 PCR 產物，再將 PCR 產物的核酸片段嵌插入 pCR2.1-TOPO 載體 (Invitrogen, California, USA) 中，並使用 QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) 進行該載體純化，之後藉由分光光度計 Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, U.S.) 測量純化的載體核酸的濃度，並使用下式計算載體拷貝數 (copy number)，此時載體拷貝數即為嵌插入的核酸片段的拷貝數：

$$\text{拷貝數 (copy number}/\mu\text{L}) = [(\text{濃度 ng}/\mu\text{L}) \times (6.02 \times 10^{23} \text{ molecules/mole})] \div [(\text{長度 bp} \times 660 \text{ g/mol}) \times (1 \times 10^9 \text{ ng/g})]$$

公式中的濃度指含嵌插入核酸片段的載體的核酸濃度，長度指 PCR 產物的核酸片段長度加上載體的核酸長度。

聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

以增幅標的位於 DEV 之 UL 區域之 7F 與 7R 引子對進行 DEV PCR，預期產物為 446 bp，PCR 反應液與反應步驟參考文獻並做調整 [6, 15]。PCR 反應液中含 15 μL Quick Taq HS DyeMix (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)，各 400 nM 正向和反向引子和

2 μ L DNA，最終加水至總體積 30 μ L。PCR 步驟包括 94°C 2 分鐘、37°C 1 分鐘與 72°C 1 分鐘的初始步驟，接著 35 個循環的 94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘和 72°C 2 分鐘，最後為 72°C 7 分鐘的延伸步驟，PCR 產物以 2%瓊膠進行電泳加以確認大小。為確定 PCR 產物的核酸序列，將所增幅出預期大小 PCR 產物以 3700XL DNA 分析儀 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) 進行商業定序服務(明欣生物科技有限公司，臺北·臺灣)，所得核酸序列再至美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 網站以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 功能進行搜尋確認 [7]。

即時 PCR (real-time PCR)

以 WOA 建議之增幅標的位於 DEV 之 UL 區域之引子與探針進行 DEV 即時 PCR，預期產物為 124 bp [15, 17]。即時 PCR 為利用 LightCycler 480 System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 機器進行，反應液為含 1 倍 LightCycler 480 Probes Master (Roche)、各 400 nM 正向和反向引子與 240 nM 探針、2 μ L 核酸，加水至總體積 20 μ L。反應條件則為 95°C 5 分鐘後進行 45 個循環之 95°C 10 秒，60°C 20 秒。為確定即時 PCR 產物的核酸序列，將所增幅出之即時 PCR 產物進行如上所述之核酸純化、選殖與增幅後，以 3700XL DNA 分析儀 (Applied Biosystems) 進行商業定序服務 (明欣生物科技有限公司)，所得核酸序列再至 NCBI 網站以 BLAST 功能進行搜尋確認 [7]。

敏感性

為檢測 PCR 與即時 PCR 的敏感性，將上述製備之標準核酸分別進行 10 倍連續稀釋，核酸量範圍為 $10^7 \sim 10^0$ 拷貝數/反應，再進行上述之 PCR 與即時 PCR，以取得此二種方法之檢測極限。

特異性

以鵝小病毒、鴨小病毒、鵝出血性多瘤病毒、鵝環狀病毒、鴨環狀病毒、鴨肝炎病毒、禽流感病毒、新城病病毒、坦布蘇病毒、雷氏桿菌、金黃葡萄球菌、

巴士德桿菌、鏈球菌與沙門氏菌之核酸進行 PCR 與即時 PCR 之特異性試驗。

即時 PCR 方法的重複性 (repeatability) 分析

為了評估即時 PCR 的變異係數 (coefficient variation, CV)，利用連續 10 倍稀釋的標準核酸進行測試 (濃度為 $10^7 \sim 10^1$ 拷貝數/ μ L)，將每個稀釋濃度的標準核酸進行三重複檢測，並根據標準偏差/幾何平均 Cp (crossing point) 的公式計算 CV 值以評估批內重複性 (intra-assay repeatability)，而批間重複性 (inter-assay repeatability) 的 CV 值則來自三次不同時間的測量值之間的差異。

PCR 應用於臨床與檢疫檢體

自 2006 年起各縣市動物防疫機關送檢之鴨場與鵝場疑似鴨瘟病例檢體進行 DEV PCR 檢測，檢測之目標臟器包括心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟、腦以及腸道。將前述臟器分別以滅菌後之磷酸緩衝鹽液製作成 10 倍乳劑，經 3,000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液進行核酸萃取；萃取之核酸進行 DEV PCR 檢測。

自 2006 年 5 月起以 PCR 進行輸入水禽之鴨病毒性腸炎檢測，由防檢局動植物檢疫中心、各分局及檢疫站進行採樣，輸入水禽每批採 5 隻，禽蛋每批採 5 顆，檢體種類包括泄殖腔拭子、死禽與種蛋。泄殖腔拭子置於輸送保存液中充分震盪混勻後進行核酸萃取；死禽取臟器依前述方法製成乳劑後進行核酸萃取；種蛋部分則將外殼以經滅菌後磷酸緩衝鹽液沖洗，而種蛋內容物 (包括蛋黃與蛋白) 與等量滅菌後磷酸緩衝鹽液混合後離心取上清液後，取沖洗液與上清液進行核酸萃取。萃取後之核酸進行 PCR 檢測。

結果

聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

以 Holland B 株 DEV 核酸進行 PCR 檢測，獲得產物經核酸序列分析確實為 446 bp，至 NCBI 網站以 BLAST 功能進行搜尋，結果顯示最為接近的序列有

37 筆，皆為 *Anatid alphaherpesvirus 1* 或 DEV 的核酸序列，核酸相似度 96.67 ~ 99.55%。

以含 $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數/反應的 DEV 核酸片段質體進行 PCR 敏感性測試，PCR 的檢測極限為 100 拷貝數，如圖 1。

特异性部分，PCR 檢測結果僅鴨腸炎病毒核酸具陽性反應，其餘包括鵝小病毒、鴨小病毒、鵝出血性多瘤病毒、鴨肝炎病毒、禽流感病毒、新城病病毒、坦布蘇病毒、雷氏桿菌、家禽霍亂菌、金黃葡萄球菌、鏈球菌、沙門氏菌、大腸桿菌、鵝環狀病毒與鴨環狀病毒之核酸皆為 PCR 陰性，顯示具特异性。

即時 PCR (real-time PCR)

以 Holland B 株 DEV 核酸進行即時 PCR 檢測，獲得產物經核酸序列分析確實為 124 bp，至 NCBI 網站以 BLAST 功能進行搜尋，結果顯示最為接近的序列有 36 筆，皆為 *Anatid alphaherpesvirus 1* 或 DEV，核酸相似度 99.17 ~ 100%。

以含 $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數/反應的 DEV 標準核酸檢測敏感性，結果顯示即時 PCR 的檢測極限為 10 拷貝數，且標準核酸 $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數/反應的對數值與 Cp (crossing point) 值具線性相關，標準曲線為 $y = -3.3487x + 40.212$ ，且其線性相關性 (R^2) 為 0.9992 (圖 2)。

特异性部分，即時 PCR 僅 DEV 核酸具陽性反應，其餘包括鵝小病毒、鴨小病毒、鵝出血性多瘤病毒、鴨肝炎病毒、禽流感病毒、新城病病毒、坦布蘇病毒、雷氏桿菌、家禽霍亂菌、金黃葡萄球菌、鏈球菌、沙門氏菌、大腸桿菌、巴士德桿菌、鵝環狀病毒與鴨環狀病毒之核酸皆為陰性，顯示具特异性。

重複性方面，利用連續 10 倍稀釋的標準核酸進行測試 (濃度為 $10^7 \sim 10^1$ 拷貝數/ μL)，將每個稀釋濃度的標準核酸進行三重複檢測。批內重複性之 CV 值為 0.1 ~ 0.99%，而批間重複性的 CV 值為 0.26 ~ 1.53%，顯示即時 PCR 有高的重複性 (表 1)。

PCR 應用於臨床與檢疫檢體

2006 年至 2021 年來自各縣市動物防疫機關進行 DEV PCR 檢測的水禽病例場數計有 147 場次鴨場與

82 場次鵝場，共計 229 場次，各年度檢測場次數如表 2，所有檢測結果皆為陰性。

2006 年至 2021 年來自防檢局送檢之檢疫案件計 43 批次，總計 250 個樣本數，各年度詳細資料如表 3，所有檢測結果皆為陰性。

討論

PCR 與即時 PCR 方法的建立可快速的進行 DEV 的檢測。在傳統上常用病毒的培養與血清學方法來分離與鑑定病毒，然而，這些試驗需要較長時間完成，而且常會遭遇需要無特定病原胚胎蛋與抗 DEV 標準血清等限制 [17]，因此，有必要建立快速檢測 DEV 的方法。依我國「動物及動物產品輸入檢疫條件」規定輸入水禽於輸入後於隔離場所隔離檢疫十日，因此輸入動物傳染病監測須於禽鳥可放行日前完成，而以 DEV PCR 方法取代抗體中和試驗克服了需要短期內即完成 DVE 檢測的問題，再加上本實驗室又建立之即時 PCR 方法，除了可更快速檢測 DEV 外，更進一步增加檢測的敏感性。

本研究建立高敏感性與專一性之 PCR 與即時 PCR 方法。研究中 PCR 方法為依據 Hansen 等人在 2000 年發表的文獻再進行調整，該文獻指出此 PCR 的檢測極限 (敏感性) 為 1 fg 的 DEV DNA，相當於 5 個病毒基因體 (genome copies) [5, 6]，此較其他文獻的 PCR 檢測極限為 100 ~ 400 fg 或 100 拷貝數低 [11, 16, 18]，而本研究之 PCR 檢測極限為 100 拷貝數。在即時 PCR 方面，本研究的即時 PCR 的檢測極限為 10 拷貝數，且標準核酸 $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數的對數值與 Cp 值具線性相關， R^2 為 0.9992，此與所依據之文獻之即時 PCR 檢測極限的 23 拷貝數，與核酸濃度於 $2.3 \times 10^1 \sim 2.3 \times 10^5$ 拷貝數的對數值與 Ct 值具線性相關， R^2 為 0.999 等結果相似 [17]，而且，本研究與文獻的即時 PCR 皆有良好之重複性結果。在專一性方面，不管是 PCR 或是即時 PCR 皆僅對 DEV 核酸產生陽性反應，其他水禽常見病原核酸之檢測結果為陰性。由此可知，本研究所建立之 PCR 與即時 PCR 具相當之敏感性與專一性。

臨床上，DVE 的診斷需要與其他造成出血性和壞死性病變的疾病作鑑別，包括家禽流行性感冒、鴨病

建立鴨腸炎病毒之聚合酶鏈反應與即時聚合酶鏈反應檢測方法

毒性肝炎、新城病、禽痘、家禽霍亂、壞死性腸炎、球蟲病和特異性中毒 [12]。本實驗室利用 DEV 疫苗株為陽性對照進行水禽病例與檢疫檢體的 DVE 的 PCR 檢測，自 2006 年以來所有檢驗結果皆為陰性。雖然本研究建立之 PCR 與即時 PCR 無法區分野外病毒株與疫苗病毒株，但臺灣目前無使用鴨瘟疫苗，因此本研究建立的方法仍可應用於臨床的檢體對於鴨瘟的檢測。

由於 DEV 如同其他疱疹病毒可造成潛伏感染 (latent infection) [14]，可利用 PCR 或即時 PCR 找出健康帶原者，Hansen 等人指出，核酸萃取自 DEV

感染鴨隻肛門拭子的 PCR 產物電泳條帶強度與來自肝臟的結果相同，因此直接以肛門拭子作為檢測標的，可以省略剖檢的步驟與時間 [6]。進口的禽類，尤其是高價值的觀賞性鳥類於檢疫時以肛門拭子作為檢測標的，是合適的選擇之一。

本實驗室建立快速高敏感性與高專一性 PCR 與即時 PCR 的 DEV 檢測方法，2006~2021 年所有水禽病例與檢疫檢體檢驗結果皆為 DEV PCR 陰性，因為本研究中 PCR 與即時 PCR 使用不同引子對，未來的水禽檢體會利用已建立的 PCR 與即時 PCR 平行檢測以提升 DEV 檢測的敏感性。

表 1、鴨腸炎病毒即時 PCR 的批內重複性與批間重複性

| 標準核 酸濃度 (copies) | 批內變異性 (intra-assay variability) | | | | | | 批間變異性 (inter-assay variability) | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|-------|-------|----------|-----------------|------|---------------------------------|-------|-------|----------|-----------------|------|
| | Crossing point | | 平均值 | 標準 偏差 | 變異 係數 (%) | | Crossing point | | 平均值 | 標準 偏差 | 變異 係數 (%) | |
| 10 ⁷ | 17.18 | 17.04 | 17.05 | 17.09 | 0.08 | 0.46 | 16.61 | 16.77 | 17 | 16.79 | 0.20 | 1.17 |
| 10 ⁶ | 19.95 | 19.78 | 19.77 | 19.83 | 0.10 | 0.51 | 18.63 | 18.85 | 18.89 | 18.79 | 0.14 | 0.75 |
| 10 ⁵ | 23.4 | 23.34 | 23.12 | 23.29 | 0.15 | 0.63 | 21.79 | 22.02 | 22.29 | 22.03 | 0.25 | 1.14 |
| 10 ⁴ | 26.68 | 26.69 | 26.64 | 26.67 | 0.03 | 0.10 | 25.18 | 25.32 | 25.77 | 25.42 | 0.31 | 1.21 |
| 10 ³ | 30.15 | 30.14 | 30.06 | 30.12 | 0.05 | 0.16 | 29.59 | 28.7 | 29.11 | 29.13 | 0.45 | 1.53 |
| 10 ² | 33.66 | 33.68 | 33.55 | 33.63 | 0.07 | 0.21 | 32.37 | 31.96 | 32.31 | 32.21 | 0.22 | 0.69 |
| 10 ¹ | 38.02 | 37.29 | 37.79 | 37.70 | 0.37 | 0.99 | 35.98 | 36.15 | 36.13 | 36.09 | 0.09 | 0.26 |

表 2、2006 年至 2021 年進行鴨腸炎病毒 PCR 檢測的送檢水禽病例場數

| 年 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 總計 |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 鴨場數 | 2 | 0 | 13 | 19 | 19 | 6 | 12 | 11 | 16 | 15 | 16 | 2 | 12 | 3 | 1 | 0 | 147 |
| 鵝場數 | 0 | 0 | 6 | 6 | 8 | 7 | 6 | 7 | 0 | 30 | 4 | 0 | 3 | 2 | 1 | 2 | 82 |
| 合計 | 2 | 0 | 19 | 25 | 27 | 13 | 18 | 18 | 16 | 45 | 20 | 2 | 15 | 5 | 2 | 2 | 229 |

表 3、2006 年至 2021 年輸入水禽檢疫監測案件數

| 年 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 總計 |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 批次數 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 | 6 | 6 | 7 | 0 | 5 | 6 | 2 | 2 | 43 |
| 樣本數 | 11 | 0 | 0 | 16 | 5 | 0 | 8 | 20 | 30 | 30 | 35 | 0 | 25 | 50 | 10 | 10 | 250 |

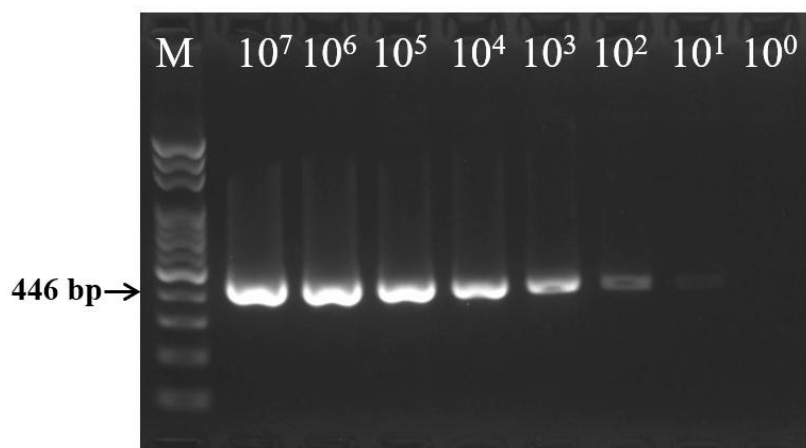


圖 1、以 PCR 偵測 10 倍連續稀釋鴨腸炎病毒核酸之電泳結果，檢測極限為 100 拷貝數。
M : 100 bp 核酸標記； $10^7 \sim 10^0$: 鴨腸炎病毒標準核酸 $10^7 \sim 10^0$ 拷貝數/反應。

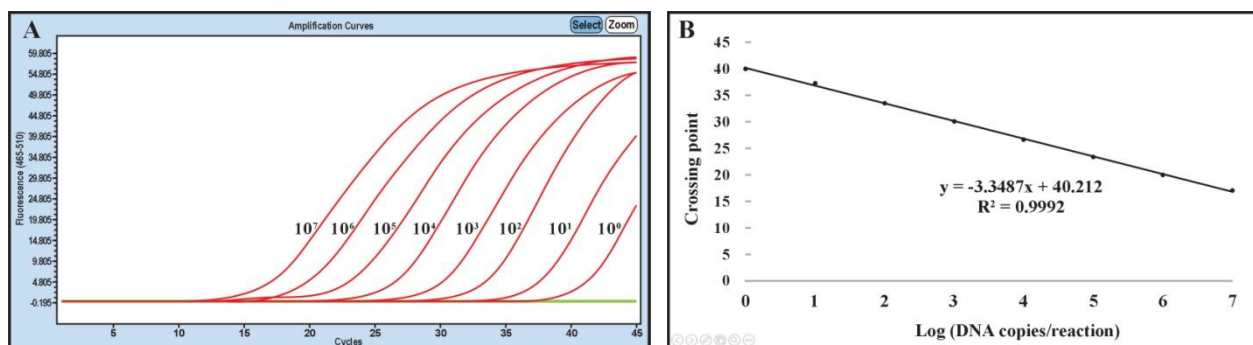


圖 2、鴨腸炎病毒之即時 PCR。

A : $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數/反應的鴨腸炎病毒標準核酸之即時 PCR 增幅曲線，結果顯示檢測極限為 10 拷貝數；
B : 即時 PCR 的標準曲線顯示 $10^0 \sim 10^7$ 拷貝數/反應的標準核酸對數值與 Cp (crossing point) 具線性相關，標準曲線為 $y = -3.3487x + 40.212$ ，且其線性相關性 (R^2) 為 0.9992。

參考文獻

- Burgess EC, Yuill TM. Vertical transmission of duck plague virus (DPV) by apparently healthy DPV carrier waterfowl. *Avian Dis*, 25:795-800, 1981.
- Campagnolo ER, Banerjee M, Panigrahy B, Jones RL. An outbreak of duck viral enteritis (duck plague) in domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata domestica*) in Illinois. *Avian Dis*, 45:522-528, 2001.
- Chen L, Yu B, Hua J, Ye W, Ni Z, Yun T, Deng X, Zhang C. Construction of a full-length infectious bacterial artificial chromosome clone of duck enteritis virus vaccine strain. *Virology*, 10:328, 2013.
- Dhama K, Kumar N, Saminathan M, Tiwari R, Karthik K, Kumar MA, Palanivelu M, Shabbir MZ, Malik YS, Singh RK. Duck virus enteritis (duck plague) –a comprehensive update. *Vet Q*, 37:57–80, 2017.

5. Hansen WR, Brown SE, Nashold SW, Knudson DL. Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 43: 106-115, 1999.
6. Hansen WR, Nashold SW, Docherty DE, Brown SE, Knudson DL. Diagnosis of duck plague in waterfowl by polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 44:266-274, 2000.
7. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
8. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2017) (Retrieved from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).
9. Khan KA, Islam MA, Sabuj AAM, Bashar MA, Islam MS, Hossain MG, Hossain MT, Saha S. Molecular characterization of duck plague virus from selected Haor areas of Bangladesh. *Open Vet J*, 11:42-51, 2021.
10. Li Y, Huang B, Ma X, Wu J, Li F, Ai W, Song M, Yang H. Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus. *Virology*, 391: 151-161, 2009.
11. Mandal PS, Mukhopadhyay SK, Pradhan S, Mondal S, Jana C, Patra NC, Hansda RN. Development of nested polymerase chain reaction-based diagnosis of duck enteritis virus and detection of DNA polymerase gene from non-descriptive duck breeds of West Bengal, India. *Vet World*, 10: 336-341, 2017
12. Metwally SA, Cheng A. Duck virus enteritis (duck plague). In: *Diseases of poultry*. 14th ed. Edited by D.E. Swayne, M. Boulianne C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair and D.L. Suarez. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 460-470, 2020.
13. Shawky SA, Sandhu TS. Inactivated vaccine for protection against duck virus enteritis. *Avian Dis*, 41:461-468, 1997.
14. Shawky SA, Schat KA. Latency sites and reactivation of duck enteritis virus. *Avian Dis*, 46:308-313, 2002.
15. World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. Chapter 3.3.7 Duck Virus Enteritis. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.07_DVE.pdf
16. Xie L, Xie Z, Huang L, Wang S, Huang J, Zhang Y, Zeng T, Luo S. A polymerase chain reaction assay for detection of virulent and attenuated strains of duck plague virus. *J Virol Methods*, 249:66-68, 2017.
17. Yang FL, Jia WX, Yue H, Luo W, Chen X, Xie Y, Zen W, Yang WQ. Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for duck enteritis virus DNA. *Avian Dis*, 49:397-400, 2005.
18. Yao M, Zhang X, Gao Y, Song S, Xu D, Yan L. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks. *BMC Vet Res*, 15:103, 2019.
19. Zou Q, Sun K, Cheng A, Wang M, Xu C, Zhu D, Jia R, Luo Q, Zhou Y, Chen Z, Chen X. Detection of anatid herpesvirus 1 gC gene by TaqManTM fluorescent quantitative real-time PCR with specific primers and probe. *Virol J*, 7:37-46, 2010.

Development of conventional and real-time polymerase chain reaction assays for duck enteritis virus

YP Chen*, F Lee, CJ Chiou

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Duck enteritis virus (DEV) is the pathogen of duck virus enteritis (DVE), which is an acute, infectious and lethal disease in waterfowl. This study established highly sensitive and specific PCR and real-time PCR assays to detect of DEV. The detection limit of the PCR was 100 copies and that of the real-time PCR was 10 copies. In addition, the logarithm of the standard DNA copy number showed a linear correlation ($R^2 = 0.9992$) with the crossing point value in the real-time PCR. Both PCR assays had high specificity for DEV detection as no positive results were given when testing other common waterfowl pathogens. From 2006 to 2021, samples from 229 waterfowl farms and 43 batches of quarantine samples were examined for DEV using the developed PCRs. All results were negative. Therefore, the established PCR and real-time PCR will be applied in parallel for future testing of the DVE diagnosis.

Keywords: *Duck enteritis virus, Duck virus enteritis, Polymerase chain reaction, Real-time polymerase chain reaction, Quarantine*