

# 二核苷酸微卫星 PCR 扩增的影子带及其来源

王吉振<sup>1</sup>, 王爱国<sup>1</sup>, 储明星<sup>2\*</sup>, 李 宁<sup>3</sup>, 傅金恋<sup>1</sup>, 易建红<sup>4</sup>, 高福才<sup>4</sup>

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;  
3. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 4. 河北省任丘市畜牧水产局, 任丘 062550)

**摘 要:** 2 个绵羊二核苷酸微卫星 BM143 和 BMS2508 的 PCR 扩增产物在非变性(中性)聚丙烯酰胺凝胶电泳(nPAGE)中形成滞后于主带的影子带。影子带比主带小 2 bp。实际上主带由两部分组成: 表明微卫星正确大小的 PCR 特异扩增的高浓度条带(特异扩增带)和比特异扩增带小 2 bp 的 PCR 非特异扩增的低浓度条带(非特异扩增带)。本试验初步证明影子带是微卫星的一条特异扩增带和一条非特异扩增带错配形成的异源双链。本研究结果表明, 影子带的出现并不改变特异扩增带在 nPAGE 中的正常迁移率。

**关键词:** 二核苷酸微卫星; 聚合酶链式反应; 影子带; 非特异扩增带; 特异扩增带; 异源双链

**中图分类号:** Q75      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0366-6964(2007)03-0241-06

## Shadow Bands in PCR Amplification of Dinucleotide Microsatellites and Their Origin

WANG Ji-zhen<sup>1</sup>, WANG Ai-guo<sup>1</sup>, CHU Ming-xing<sup>2\*</sup>, LI Ning<sup>3</sup>,  
FU Jin-lian<sup>1</sup>, YI Jian-hong<sup>4</sup>, GAO Fu-cai<sup>4</sup>

(1. *College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China*; 2. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*; 3. *National Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China*; 4. *Bureau of Animal Husbandry and Aquatic Aquiculture of Renqiu City of Hebei Province, Renqiu 062550, China*)

**Abstract:** The PCR products of two ovine dinucleotide microsatellites BM143 and BMS2508 were separated on nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (nPAGE). Shadow bands were seen 2 bp below the main bands. Actually the main band was composed of two components: specifically a PCR-amplified high-density band that indicates the correct size of the microsatellite (specific band) and nonspecifically a PCR-amplified low-density band that is 2 bp shorter than the specific band (nonspecific band). The results of this study preliminarily demonstrated that the shadow band was heteroduplex DNA formed by a specific band and a nonspecific band. Appearance of shadow bands did not change the normal mobility of specific bands on nPAGE.

**Key words:** dinucleotide microsatellite; polymerase chain reaction; shadow band; nonspecific band; specific band; heteroduplex

微卫星多态 DNA 序列在遗传学研究中的应用变得极为重要。聚合酶链式反应(PCR)广泛应用于微卫星多态 DNA 序列的分析中。可是, 对二核苷

酸重复以及有时三核苷酸重复, 影子带的存在使等位基因的分析复杂化。在二核苷酸重复的情形中, 除 PCR 产物主带以外, 还出现比主带小 2 bp 的影

收稿日期: 2006-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300248; 30140004 和 39770541)

作者简介: 王吉振(1976-), 男, 安徽人, 博士, 从事分子遗传学研究。Tel: 010-62733743; E-mail: jwang27@uic.edu

\* 通讯作者: 储明星, 博士, 研究员, 博导, 主要从事分子数量遗传学研究。Tel: 010-62819850, E-mail: mxchu@263.net

子带<sup>[1,2]</sup>。如果等位基因相差 2 bp,则这些影子带的存在特别麻烦。

考虑到用二核苷酸重复进行 PCR 的重要性,我们分析了存在于这些影子带中的序列。如果能够确定这些影子带产生的机理,那么就可以采取措施来消除或减少影子带的发生。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小尾寒羊 77 只母羊血样采自山东省嘉祥种羊

场。这些母羊是随机选择的,并且彼此之间没有亲缘关系。颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝,-20 °C 冻存。用苯酚氯仿抽提法从全血中提取基因组 DNA,溶于 TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)),4 °C 保存。

### 1.2 微卫星引物

微卫星引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 2 个绵羊二核苷酸微卫星座位的引物序列

Table 1 Primer sequences of two ovine dinucleotide microsatellite loci

座位 Locus	来源 Source	引物序列 (5'→3') Primer sequences(5'→3')
BM143	Montgomery G W, <i>et al</i> <sup>[3]</sup>	Forward: ACCTGGGAAGCCTCCATATC Reverse: CTGCAGGCAGATTCTTTATCG
BMS2508	GenBank G18959 <sup>[4]</sup>	Forward: TTTCTGGGATTACAAAATGCTC Reverse: TTTCTTAGGGAGTGTGATTC

本研究中使用的这两个微卫星都已测序。结果表明它们是完全的(TG)<sub>n</sub> 微卫星。

### 1.3 微卫星分型

反应总体积为 10 μL。PCR 反应体系组成:1×PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,dNTPs 终浓度为 200 μmol/L,引物终浓度为 0.2 μmol/L,Taq DNA 聚合酶 1 U,绵羊基因组 DNA 25 ng。PCR 产物装入非变性聚丙烯酰胺凝胶中,在 170 V 电压下,在 1×TBE 缓冲液中电泳 15~20 h。电泳后银染确定片段大小。本研究中两个微卫星分型详见储明星等<sup>[5,6]</sup>。

### 1.4 从 nPAGE 中回收条带

一个纯合微卫星座位的 PCR 产物在 nPAGE 中分离。电泳后银染,分别从胶中切出影子带、纯合带和混合带,并用 GeneClean II kit(Promega, Madison, WI, USA)回收。

### 1.5 影子带和主带的测序

回收一个纯合微卫星座位的 PCR 产物的影子带和主带,并分别连接到 pGEM-T 载体上,然后转化到大肠杆菌 DH5α 中,挑取经酶切鉴定的阳性克隆在全自动 ABI 377 测序仪上进行直接双向测序。每种基因型选取两个克隆测序,每个克隆测序两次。测序反应由北京鼎国生物技术有限公司完成。

### 1.6 通过 PCR 鉴定影子带中的特异扩增带和非特异扩增带

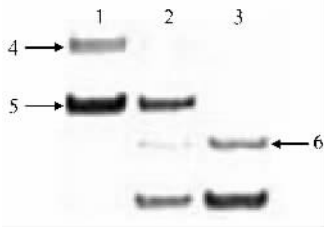
从 nPAGE 中回收一个纯合微卫星 BM143 座位的 PCR 产物的影子带并转化到大肠杆菌 DH5α 中。提取阳性克隆的质粒作为 PCR 的模板。在 nPAGE 中分离 PCR 产物以确定其大小。

## 2 结果

### 2.1 二核苷酸微卫星的 nPAGE

如图 1,二核苷酸微卫星 DNA 的 PCR 扩增产物经 nPAGE 后,银染的结果如下:纯合子产生两条带,杂合子产生 4 条带;纯合子电泳图中,泳动快的一条带银染颜色深,称之为“主带”(图 1 的条带 5),滞后的一条带颜色比“主带”浅,称之为“影子带”(图 1 的条带 4 和 6)。在杂合子电泳图中,二者的颜色深浅差异更大,即“主带”相对于“影子带”更为明显。在杂合子中能观察到每个等位基因对应的主带和影子带(图 1 的泳道 2)。影子带总是和对应的主带一起出现。主带表明微卫星 PCR 产物的正确大小。本研究中,两个二核苷酸微卫星都出现影子带。如图 2,同样条件下,随机选择的非微卫星座位的 PCR 产物(约 200 bp)的电泳结果只出现表明正确大小的一条带,没有出现影子带。这导致我们推测影子带的出现可能与这些微卫星的特殊序列——二核苷酸重复有关。

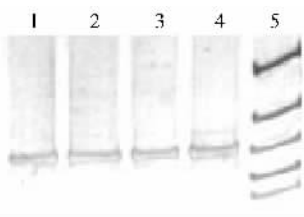
实际上主带由两部分组成:PCR 特异扩增的高



1、3. 纯合子;2. 杂合子;5. 主带;4、6. 影子带  
1,3. PCR products of homozygotes;2. PCR product of a heterozygote;5. The main band;4, 6. The shadow bands.

图 1 微卫星 BMS2508 的 nPAGE 结果

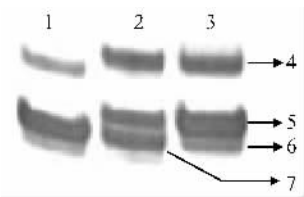
Fig. 1 PCR products of microsatellite BMS2508 were run on nPAGE



1、2、3、4. 非微卫星座位的 PCR 产物;5. 分子量标准 pBR322/*Hae* III  
1,2,3,4. PCR products of the non-microsatellite locus;  
5. The DNA molecular weight pBR322/*Hae* III

图 2 非微卫星座位的 nPAGE 结果

Fig. 2 PCR products of one non-microsatellite locus were run on nPAGE



1. 纯合子 AA;2. 杂合子 AB(等位基因 A 比等位基因 B 小 2 bp);3. 纯合子 BB;4. BB 的影子带;5. BB 的特异带;6. BB 的非特异带;7. 杂合子 AB 的等位基因 A 的 PCR 产物

1. The PCR product of the homozygote AA;2. The PCR product of the heterozygote AB (allele A is 2 bp smaller than allele B);3. The PCR product of the homozygote BB;4. The shadow band for BB;5. The specific band for BB;6. The nonspecific band for BB;7. The PCR product for allele A of heterozygote AB

图 3 微卫星 BM143 的 nPAGE 结果

Fig. 3 PCR products of microsatellite BM143 were run on nPAGE

浓度条带(图 3 中的条带 5,本研究称为特异带)和比特异扩增带小 2 bp 的 PCR 非特异扩增的低浓度

条带(图 3 中的条带 6,本研究称为非特异带)。纯合子 BB 的影子带的大小与杂合子 AB 的相同,而纯合子 AA 的影子带则较小(图 3)。BB 和 AB 的影子带相同,而 BB 和 AA 的影子带不同,其原因可能包含在影子带的形成之中。两个等位基因相差 2 bp 的 AB 的两条带(两个等位基因 A 和 B 的 PCR 产物)在大小上与也相差 2 bp 的 BB 的特异带和非特异带(图 3 中的条带 5 和 6)是相同的。AA 的特异带和非特异带的大小分别比 BB 的小 2 bp,这正是 BB 与 AA 之间的差异。很显然,相差 2 bp 的两条带的大小决定了所形成的影子带的大小。因此,大小上相差 2 bp 的两条带很可能形成影子带。

## 2.2 从 nPAGE 中回收纯合带、混合带和影子带

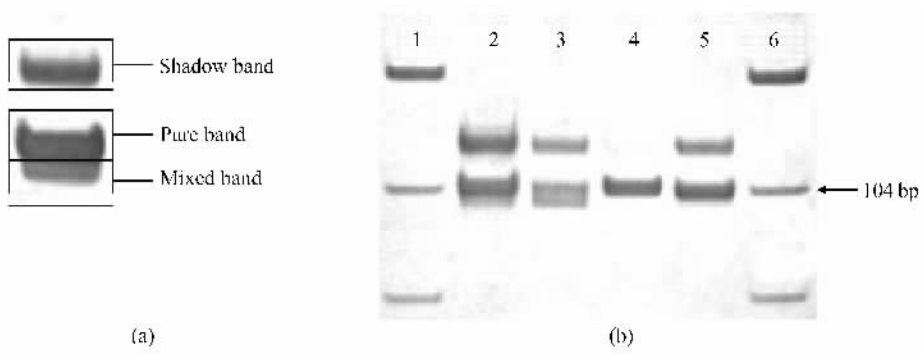
因为特异带与非特异带只相差 2 bp,在 nPAGE 中准确地切开它们是不可能的,因此我们选择从特异带中间切开。这样,上面部分一定只含有纯合的特异带(纯合带),下面部分一定含有特异带和非特异带组成的混合物(混合带)(图 4a)。回收的纯带 nPAGE 后仅有一条极明显的特异带出现(图 4b 的泳道 4)。而混合带与 PCR 产物两者均有一条明显的特异带、一条影子带和一条极弱的非特异带(图 4b 的泳道 2 和 5)。影子带 nPAGE 后出现同样明显的特异带、非特异带和影子带。从 PCR 产物中回收的混合带只含有特异带和非特异带,没有影子带。但是,混合带的 nPAGE 却产生了原来不存在的影子带(图 4b 中的泳道 5)。回收的影子带的 nPAGE 除了产生影子带以外,还出现了特异带和非特异带(图 4b 中的泳道 3)。因此,影子带一定由一条特异带和一条非特异带组成。回收的只含有特异带的纯合带的电泳结果只出现特异带,表明影子带的形成需要同时具有特异带和非特异带。所以,影子带是特异带和非特异带形成的异源双链。

## 2.3 通过 PCR 鉴定影子带中存在特异带与非特异带

挑取 17 个影子带阳性克隆的质粒,以其为模板 PCR,PCR 产物的 nPAGE 结果如图 5 所示。结果证明影子带中同时含有特异带和非特异带。

## 2.4 测序验证

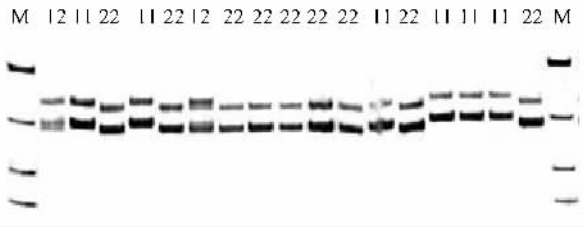
从 nPAGE 中回收微卫星 BMS2508 座位上的一个纯合子(99 bp/99 bp)的 PCR 扩增产物的影子带和主带并分别克隆。对从阳性克隆中提取的质粒的测序表明 3 个主带克隆测序结果和 2 个影子带克隆的完全一致,这证明影子带和主带都含有特异带(99 bp)。



1,6. pBR322/*Hae* III; 2. PCR 产物; 3. 回收的影子带; 4. 回收的纯合带; 5. 回收的混合带  
 1,6. DNA molecular weight marker pBR322/*Hae* III; 2. The PCR product; 3. The recovered shadow band;  
 4. The recovered pure band; 5. The recovered mixed band

图 4 (a) 用来说明从一个纯合微卫星座位的 PCR 产物中回收条带的 nPAGE 结果示意图  
 (b) 从 BM143 一个纯合子的 PCR 产物中回收纯合带、混合带和影子带的 nPAGE 结果

Fig. 4 (a) A diagram was used to demonstrate the bands recovered from the PCR product of one homozygous microsatellite locus on nPAGE. (b) Recovered pure band, mixed band and shadow band from the PCR product of a BM143 homozygote on nPAGE



M, pBR322/*Hae* III; 1. 克隆影子带中的特异带 (104 bp); 2. 克隆影子带中的非特异带 (102 bp)

M, DNA molecular weight pBR322/*Hae* III; 1. The presence of specific band (104 bp); 2. The presence of nonspecific band (102 bp) in the cloned shadow band

图 5 通过 PCR 鉴定影子带中存在的特异带与非特异带

Fig. 5 Identification of the presence of specific band and nonspecific band in the shadow band by PCR

```

up-12 CTGCAGGCAGATTCTTTATCGACTGAGCNACCAGGGAAGCACTTTATATGTGTGTGTGTG
low-11 CTGCAGGCAGATTCTTTATCGACTGAGCNACCAGGGAAGCACTTTATATGTGTGTGTGTG
up-2 CTGCAGGCAGATTCTTTATCGACTGAGCNACCAGGGAAGCACTTTATA - - TGTGTGTGTG

up-12 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCATAGATATGGAGGCTTCCCAGGT 104 bp
low-11 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTCATAGATATGGAGGCTTCCCAGGT 104 bp
up-2 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTCATAGATATGGAGGCTTCCCAGGT 102 bp
  
```

Up-2 和 up-12 是克隆影子带的测序结果 (对 up-2 测序 3 次以证实缺少一个 AC/TG 重复);  
 low-11 是克隆主带的测序结果。- 表示缺少一个碱基

Up-2 and up-12 are the sequencing results of the cloned shadow bands (up-2 was sequenced three times to confirm the lack of one AC/TG repeat.); low-11 is the sequencing result of the cloned main band. - indicates the lack of one base.

图 6 图 4(b) 中同一纯合微卫星 BM143 的克隆影子带和克隆混合带的测序结果比较  
 Fig. 6 Sequencing results of cloned shadow band and cloned mixed band of the same homozygous microsatellite (BM143) of Figure 4(b) were compared

回收微卫星 BM143 座位上的一个纯合子 (104 bp/104 bp) 的 PCR 扩增产物的影子带和主带并分别克隆。测序证实特异带 (104 bp, up-12) 和非特异带 (102 bp, up-2) 同时存在于影子带中。非特异带比特异带 (up-12) 和主带 (low-11) (104 bp) 少一个 AC/TG 二核苷酸重复 (图 6)。测序证实影子带中不仅含有特异带, 而且含有比特异带少一个 AC/TG 重复的非特异带, 表明影子带由特异带和非特异带两者组成。

### 2.5 特异带和非特异带在 nPAGE 中的泳动速度正常

在图 4b 中, 根据分子量标准计算, 特异带的长度为 104 bp, 非特异带的长度为 102 bp, 与图 6 中

的测序结果一致。完全配对的特异带和非特异带在 nPAGE 中的泳动速度正常,在凝胶中可以准确判断其长度。由于不完全配对的 DNA 区域空间构象的影响,影子带在 nPAGE 中的泳动速度比特异带和非特异带的慢,所以凝胶银染后观察到的影子带滞后于特异带和非特异带。影子带的出现并不改变表明微卫星正确大小的特异扩增带在 nPAGE 中的正常迁移率。

### 3 讨论

#### 3.1 影子带与二核苷酸微卫星的特殊序列有关

本研究中,在同样电泳条件下,二核苷酸微卫星的 PCR 扩增产物在 nPAGE 中出现影子带,而非微卫星座位的 PCR 扩增产物则没有出现影子带。含有二核苷酸重复的 DNA 序列的 PCR 产生一条主带以及比主带小 2 bp 的几条影子带<sup>[1,2]</sup>。二核苷酸重复区中 2 bp 随机缺失可以产生影子带。含有一个重复长度的单个克隆不产生影子带<sup>[7]</sup>。因此,笔者认为影子带的出现与二核苷酸微卫星的特殊序列——二核苷酸重复有关。

复制期间的滑动是观察到的一个群体的个体之间简单序列长度多态性的原因<sup>[8]</sup>。常规 PCR 改变了单核苷酸和二核苷酸重复长度,一般降低了重复数<sup>[7]</sup>。研究表明影子带产生于 PCR 过程中,因为基因组 DNA 模板并不含有影子带<sup>[2,9~11]</sup>。正负链电泳行为的差异是影子带产生的原因之一<sup>[12]</sup>。PCR 过程中滑动链错配是影子带产生的主要机理<sup>[1,2,11]</sup>。

#### 3.2 影子带是特异带和非特异带之间错配形成的异源双链 DNA

本研究描述的试验表明二核苷酸微卫星的 PCR 扩增产物在 nPAGE 中出现的影子带由一条特异带和由滑动复制引起的比特异带小 2 bp 的一条非特异带组成。影子带的形成需要同时具有特异带和非特异带,非特异带比特异带缺少一个 AC/TG 二核苷酸重复。影子带在 nPAGE 中的泳动速度比特异带和非特异带(完全配对的双链 DNA)慢。所有这些导致下列假设:影子带是由特异带和非特异带之间错配形成的具有环状结构的异源双链 DNA。特异带和非特异带之间除了大小上相差 2 bp 外完全相同使得单链产物有可能处于错配构象中形成异源双链 DNA,使得一些区域在结构上形成不配对的、突出的环,正是这一突出的环状结构减慢了异源双链 DNA 在 nPAGE 中的泳动速度。

上述假设可以很好地解释本研究中观察到的现象(图 4b)。双链 DNA 变性、退火,在 PCR 过程中形成双链 DNA。因为影子带是由特异带和非特异带组成的异源双链,它一定含有相等数量的特异带和非特异带两条单链,这与回收的影子带显示相等浓度的特异带和非特异带双链(图 4b 的泳道 3)是一致的。对于 PCR 产物,非特异带产量低,相当数量的非特异带形成影子带(异源双链),因此,在 PCR 产物的凝胶图像中只能观察到少量的非特异带。

#### 3.3 影子带的减少(或消除)

已提出很多方法来减少影子带的发生。其中重要的改进方法包括使用含有甲酰胺和尿素的凝胶、通过毛细管印迹将分离的等位基因片段转移到尼龙膜并用座位特异的寡核苷酸探针探测尼龙膜<sup>[13]</sup>;使用无需电泳的 PCR 直接测序<sup>[9]</sup>;使用具有高效的耐热 DNA 聚合酶(例如, Pwo DNA 聚合酶)<sup>[2,10]</sup>;以及使用不对称的 PCR<sup>[12]</sup>。使用这些方法可以部分或完全地消除影子带。

#### 参考文献:

- [1] Hauge X Y, Litt M. A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR[J]. *Human Molecular Genetics*, 1993, 2(4):411~415.
- [2] Murray V, Monchawin C, England P R. The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(10):2 395~2 398.
- [3] Montgomery G W, Lord E A, Penty J M, *et al.* The Booroola fecundity (*FecB*) gene maps to sheep chromosome 6[J]. *Genomics*, 1994, 22(1):148~153.
- [4] Stone R T. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank> accession number G18959.
- [5] 储明星,王吉振,王爱国,等. 小尾寒羊 4 个微卫星座位的克隆及序列分析[J]. *遗传学报*, 2002a, 29(5):402~405.
- [6] 储明星,王吉振,王爱国,等. 小尾寒羊五个微卫星座位遗传多态性研究[J]. *遗传学报*, 2002b, 29(6):502~506.
- [7] Clarke L A, Rebelo C S, Goncalves J, *et al.* PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences[J]. *Mol Pathol*, 2001, 54(5):351~353.
- [8] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple

- sequence DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(2):211~215.
- [9] Murray V, Monchawin C, England P R, *et al.* Direct PCR sequencing of dystrophin polymorphic CA-CA alleles after purification to remove shadow bands[J]. *DNA Cell Biol*, 1992, 11(8):637~640.
- [10] 武辉,张思仲,肖翠英. 三核苷酸重复序列 PCR 扩增中影子带的产生及其消除的方法[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15(1):42~45.
- [11] Rodriguez S, Visedo G, Zapata C. Detection of errors in dinucleotide repeat typing by non-denaturing electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(13): 2 656~2 664.
- [12] 赵红珊,黄尚志,李辉,等. 短重复序列 PCR 产物变性胶电泳影子带新解——正负链电泳行为的差异[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16(5):328~330.
- [13] Litt M, Hauge X, Sharma V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures[J]. *Biotechniques*, 1993, 15(2): 280~284.

## 动物疫情快速

### 阿富汗发生高致病性禽流感

2007年2月22日,阿富汗向OIE报告了发生的2起禽流感疫情。报告人是阿富汗畜牧兽医服务机构主席Azizullah Osmani。病原是H5N1亚型高致病性禽流感病毒。疫情始于2007年2月12日,于2007年2月22日确认。诊断方法为临床检查结合实验室诊断。一个疫区位于NANGARHAR省Nangarhar,感染动物是庭院饲养的家禽,有187例易感动物,70例病例,死亡70只;另一疫区位于KUNAR省Soki地区,感染动物是火鸡,有15例易感动物,3例病例,死亡3只。感染来源尚不清楚。实验室诊断在喀布尔的中央诊断实验室(国家实验室)进行,所用方法包括RT-PCR和ELISA,结果均呈阳性。阿富汗采取的控制措施:国内限制移动、紧急免疫、设施及设备消毒、检疫;即将进行筛查和扑杀。阿富汗上一次发生高致病性禽流感是在2006年。

### 科威特发生高致病性禽流感

2007年2月26日,科威特向OIE报告了禽流感疫情。此次暴发属临床病例,由H5N1亚型高致病性禽流感病毒引起。疫情始于2007年2月13日,于2007年2月18日确认。诊断方法为临床剖解、实验室诊断。疫区分布在6个地方:①AL FARWANIYAH省Al Omaria地区Al Omaria的科威特动物园,始于2007年2月17日,动物园内有不同鸟类,但仅在猎鹰发病;疫情发生后即对其他易感动物进行了免疫接种。该疫区有1000只易感动物,病例7例,死亡5例,销毁2例。②AL AHMADI省Al Wafra地区Wafra的养殖场,饲养动物有鸡、鸭、鹅、珍珠鸡和鸽。在该地区确诊高致病性禽流感病例后的监测中发现该场存在感染,在2只珍珠鸡检出抗体。该场有670只易感动物,病例2例,未出现死亡,销毁668例。③AL AHMADI省Al Wafra地区Wafra的另一养殖场,有着包括鸡、鸭、火鸡和鸽的多种鸟类。该场一死亡火鸡的组织样品经检测呈H5N1阳性。该场有1805只易感动物,病例1例,死亡1例,销毁1804例。④AL AHMADI省Al Nwasib地区Nwasib的养殖场,饲养有鸡、火鸡、鸭和鸽等多种鸟类,鸡和火鸡均被感染。该场有114只易感动物,病例20例,死亡20例,销毁94例。⑤AL AHMADI省Um Alhiman地区Um Alhiman的养殖场,有47只易感鸡,病例2例,死亡2例,销毁45例。⑥AL AHMADI省Al Wafra地区Wafra的养殖场,有15只易感鸡,病例15例,死亡15例。第一例病例猎鹰出现后开始有家禽死亡的报道。首例鸡死亡的报道来自2个个案,自市场购入的鸟2d后死亡。随后加强了全国的疫情监测。感染来源尚不清楚。实验室诊断由兽医实验室及研究部门(国家实验室)进行,手段为快速检测和real-time PCR,结果呈阳性。2007年2月23日,英国VLA Weybridge实验室(OIE参考实验室)提交的real-time PCR结果也呈阳性。科威特采取的控制措施:国内限制移动、紧急免疫、设施及设备消毒、扑杀;即将实施区域化措施。

### 斯洛文尼亚发生鱼传染性造血器官坏死症

2007年2月27日,斯洛文尼亚代理首席兽医官Simona Salamon夫人向OIE报告了传染性造血器官坏死症疫情。疫情始于2007年1月10日,于2007年2月1日确认,属临床病例,诊断方法为临床诊断和实验室检验。负责实验室检验的是国家兽医研究所,病原的培养及免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)均为阳性。引起此次疫情的病原是传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)。疫区位于新戈里察市Ribogojnica“Kanomlja”的一个采用半封闭生产方式的淡水养殖场,感染动物为虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*),发病率和死亡率均为25%,共有易感鱼12000尾,有3000尾发病,死亡3000尾。感染来源尚不清楚。斯洛文尼亚采取的控制措施:检疫、追溯、封锁区和/或缓冲区内外的监测、官方销毁感染动物和水生动物产品;即将采取消毒措施。斯方禁止免疫,采用土霉素对动物进行治疗以防止二次感染。斯洛文尼亚上一次发生传染性造血器官坏死症是在2006年6月30日。