

傅光华, 陈红梅, 黄瑜, 等. 雏番鸭胰腺型鸭 1 型甲肝病毒分离鉴定及 VP1 基因分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 945—950.
FU G-H, CHEN H-M, HUANG Y, et al. Identification and Sequence Analysis of Duck Hepatitis A Virus Type 1 Isolated from Muscovy Duckling with Pancreatitis [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 945—950.

雏番鸭胰腺型鸭 1 型甲肝病毒分离鉴定及 VP1 基因分析

傅光华, 陈红梅, 黄瑜, 施少华, 彭春香, 江斌, 程龙飞, 万春和,
傅秋玲, 林建生, 林芳

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 采集自胰腺发黄或出血的雏番鸭病料经 RT-PCR 检测为鸭 1 型甲肝病毒阳性后, 接种 11 日龄非免疫番鸭胚获得一株病毒 (命名为 MPZJ1206)。该株病毒在不同温度下均不凝集鸡、鸭和绵羊红细胞; 鸭胚中和试验表明蚀斑纯化毒可被经典的鸭 1 型甲肝病毒高免血清特异性所中和。该株病毒对 7 日龄雏番鸭的致死率为 38.5%, 病死鸭剖检病变与临床发病鸭相同, 且从病死鸭脏器中回收分离到的病毒经鉴定仍为鸭 1 型甲肝病毒。应用鸭 1 型甲肝病毒 VP1 基因特异性引物从该株病毒克隆获得的 714 bp 的基因片段, 与经典鸭 1 型甲肝病毒分离株 Du/CH/LGD/111239 VP1 基因的同源性最高, 为 99.1%, 经遗传进化分析表明该株病毒属鸭 1 型甲肝病毒谱系。以上结果表明, 雏番鸭胰腺炎是由鸭 1 型甲肝病毒感染所致, 这一新病型明显不同于经典的鸭 1 型甲肝病毒感染引起的肝脏出血, 鉴于此, 建议将本试验分离株命名为胰腺型鸭 1 型甲肝病毒。

关键词: 鸭甲肝病毒; 胰腺型; 雏番鸭; VP1 衣壳蛋白

中图分类号: S 852

文献标识码: A

Identification and Sequence Analysis of Duck Hepatitis A Virus Type 1 Isolated from Muscovy Duckling with Pancreatitis

FU Guang-hua, CHEN Hong-mei, HUANG Yu, SHI Shao-hua, PENG Chun-xiang, JIANG Bin,
CHENG Long-fei, WAN Chun-he, FU Qiu-ling, LIN Jian-sheng, LIN Fang

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Samples came from Muscovy ducklings with yellowed or hemorrhagic pancreatitis were positive for duck hepatitis A virus-1 (DHAV-1) by RT-PCR. A virus strain (named as MPZJ1206) was obtained from Virus-containing allantoic fluid after inoculation of embryonated Muscovy duck eggs with DHAV-1—positive samples. The isolate shows no hemagglutinating activity with chickens, ducks or sheep red blood cells at different temperature. Plaque purified virus was specifically neutralized by anti-DHAV-1 hyperimmune serum. Seven-day-old Muscovy ducklings inoculated with the virus showed a mortality rate of 38.5%, and yielded the same pathological characteristics as those of clinical onset duck had. The virus strain also recovered from the pancreas of Muscovy duckling died in the trials. A 714-bp fregment gene was obtained by using a set of primers aimed at VP1 ORF gene, and shared 99.1% nucleotide sequence identity with that of classical DHAV-1 strain Du/CH/LGD/111239. Phylogenetic analysis showed that MPZJ1206 strain lay in the viral lineage of DHAV-1. The above results indicate that pancreatitis in Muscovy ducklings was caused due to the infection of duck hepatitis A virus type 1, and this pathotype is distncted from hemorrhagic hepatitis caused by classical duck hepatitis A virus, so it advised that the virus isolated in this study could be named as pancreatitis-type DHAV-1.

Key words: duck hepatitis A virus; pancreatitis; muscovy duckling; VP1 protein

收稿日期: 2012—08—26; 修回日期: 2012—09—18

作者简介: 傅光华 (1977—), 男, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学研究

通讯作者: 黄瑜 (1966—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: hangyu_815@163.com)

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-43); 福建省自然科学基金 (2011J01113); 福建省种业创新专项 (2011FJZY-9); 福建省农业科学院科技下乡 “双百” 行动项目 (SBMX1224)

自 1950 年 Levine 从发生肝炎的鸭病料中分离到第 1 株肝炎相关病毒后,目前有 2 种不同的病毒可引起鸭发生肝炎,包括鸭甲肝病毒(duck hepatitis A virus, DHAV)和鸭星状病毒(duck astrovirus, DAsV),其中鸭星状病毒又分为鸭 I 型星状病毒(DAsV-I)和鸭 II 型星状病毒(DAsV-II)^[1-3]。这 2 种病毒中 DHAV 最为常见,在世界范围内呈广泛流行,该病毒是小 RNA 病毒科(Picornaviridae)禽肝病毒属(Avihepatovirus)的成员,主要侵害 6 周龄内,尤其是 3 周龄内的雏鸭,表现为发病急、病程短、传播快、死亡率高,雏鸭日龄越小,死亡率越高,成年鸭可感染但不发病^[2]。现有研究表明我国饲养的鸭群近年来暴发的鸭病毒性肝炎主要由 DHV-I 感染引起^[4],此外还有部分病例是由 DAsV-I 感染引起^[5]。

目前发现, DHAV 包含 3 种基因型(或血型),分别命名为鸭甲肝病毒(duck hepatitis A virus, DHAV) 1, 2 和 3 型^[6-7]。DHAV-1 即为传统的血清 1 型鸭肝炎病毒(Duck hepatitis virus type 1, DHV-1)^[8-10], DHAV-2 和 DHAV-3 分别为近来报道的台湾新型^[11]和韩国新型^[12],在我国的鸭群流行鸭肝炎病毒除了主要的 DHAV-1 外, DHAV-3 近来也日渐增多^[13-15]。雏鸭感染鸭肝炎病毒后多呈现弓反张临床症状,剖检可见肝脏呈特征性的出血性病变,是否出现这种特征性的剖检病变是作为该病临床诊断的重要依据之一^[2]。2005 年 Guérin 等从表现脑炎和胰腺炎的番鸭中分离到鸭 I 型肝炎病毒,发病鸭肝脏无明显的出血性病理变化^[16],这表明鸭 I 型肝炎病毒感染的致病型除了常见的出血性肝炎外,还可引起发病鸭的脑炎和胰腺炎。

2011 年 9 月以来,福建、浙江、上海等地饲养的 10~30 日龄雏番鸭有的发生以胰腺发黄、出血(俗称胰腺炎)为特征的疫病,其发病率 10%~30%,病死率 25%~40%。我们对患该病的雏番鸭病例开展了病原学研究,初步确定其病原为鸭 1 型甲肝病毒,但所致病变不同于典型的鸭 1 型甲肝病毒,主要引起雏番鸭胰腺发黄和出血等病变。兹报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试验动物和血清

11 日龄番鸭胚、1 日龄雏番鸭等均来自非免疫种鸭场,鸭 1 型甲肝病毒高免血清由中国农业大学动物医学院苏敬良博士惠赠,鸭胚成纤维细胞

(DEF) 按常规方法制备。

1.2 主要试剂

Trizol 抽提试剂购自广州英韦创津生物科技有限公司;OMEGA Gel extraction Kit、Blood DNR/RNA extraction kit 购自厦门泰京生物技术有限公司;Reverse transcription kit、DNA Maker 均购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司, FastPfu DNA Polymerase, dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), pEASY-Blunt 载体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 临床样品的采集、处理和病毒检测

1.3.1 病料的处理及核酸制备 采集胰腺炎病死番鸭胰腺,按常规方法匀浆后,以含双抗无菌 PBS 缓冲液(pH 7.2)进行 1:3 稀释,分成 2 份,反复冻融 3 次后,取 1 份进行 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清用 OMEGA 公司的 Blood DNR/RNA extraction kit 分别提取尿囊液总 DNA 和 RNA,参照试剂盒操作说明书进行。提取获得的 RNA 样品按 Reverse transcription kit 操作说明书,用六碱基随机引物反转录获得 cDNA, cDNA 和提取获得的 DNA 分别作为下一步进行 PCR 扩增的模板。

1.3.2 病毒的 PCR 检测 参照已报道的鸭主要常见病毒病检测方法^[15,17-2],检测样品是否含有番鸭细小病毒、小鹅瘟病毒、产蛋下降综合症病毒、鸭瘟病毒、鸭甲肝病毒(DHAV-1 型和 DHAV-3 型)、鸭坦布苏病毒及鸭呼肠孤病毒等,禽流感病毒和新城疫病毒的检测分别参照 2007 年颁布的《高致病性禽流感防治技术规范》及 2008 年颁布《新城疫诊断技术》(GBT 16550-2008)提供的方法进行。以 1.3.1 节制备的模板进行 PCR 扩增,反应体系 $25 \mu\text{L}$,反应体系为: $10 \times \text{Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, Fast PFU DNA polymerase (Transgen 公司) $0.5 \mu\text{L}$ ($2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 引物各 $0.5 \mu\text{L}$, 模板 $2 \mu\text{L}$, 用去离子水补充体积为 $25 \mu\text{L}$,反应条件如下: 94°C 预变性 5 min,按 94°C 30 s, $57 \sim 53^\circ\text{C}$ 30 s, 72°C 1 min 进行 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min 结束反应,取产物 $5 \mu\text{L}$ 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。扩增产物经琼脂凝胶纯化后,回收 PCR 产物直接送生工上海生物工程有限公司进行测序。

1.4 病毒的分离、纯化

取 1.3.1 节处理的病料,经 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取上清经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器抽滤后经尿囊腔接种 5 枚无母源抗体的 11 日龄番鸭胚,每枚 0.2 mL , 37°C 孵育,每日观察 2 次,无菌收集 24~120 h 的番鸭胚胚液,经无菌检验后,以 11 日龄

番鸭胚继续传 3 代，无菌回收含毒胚液。应用 1.3 节的检测方法对尿囊液进行 DHV-1 的鉴定，同时按常规方法^[22]分别在 37℃ 和 4℃ 下测定分离病毒对鸡红细胞、鸭红细胞、绵羊红细胞的血凝活性，病毒保存于-80℃ 备用。

制备鸭胚成纤维细胞单层，当细胞单层达到 95% 完全覆盖时，将 1 000 倍稀释的含毒鸭胚尿囊液接种至细胞单层。置 37℃ 吸附 1 h，弃除病毒液，用 PBS 清洗 2 次后，铺上 1% 琼脂糖，凝固后置于 37℃ CO₂ 恒温培养箱培养 72 h。挑取单个蚀斑进行下一轮蚀斑纯化，经 3 轮纯化后，挑取单个纯化的病毒接种 11 d 鸭胚进行病毒增殖。

1.5 病毒的鸭胚中和试验

随后按常规方法^[22]进行鸭胚中和试验。按固定血清稀释病毒法，将获得的蚀斑克隆株鸭胚液毒进行 10 梯度稀释，取 10³~10⁷ 范围内的 5 个稀释度的病毒分别分成 2 份，1 份与 I 型鸭肝炎病毒高免血清等量混合，另外 1 份分别与正常鸭血清等量混匀，均放置 37℃ 作用 1 h 后，每个稀释度的病毒血清混合液接种 5 枚 10 日龄番鸭胚，每胚 0.1 mL，同时设病毒对照和血清对照组，置 37℃ 温箱观察培养 7 d，每天观察记录死亡情况，并按 Reed- Muench 法计算病毒中和组的 ELD₅₀、病毒对照组的 ELD₅₀ 及其中和指数。

1.6 雏番鸭人工感染试验

将 30 羽 DHV-1 抗体阴性的 1 日龄番鸭随机分成 2 组，每组均为 13 羽。观察饲养致 7 日龄后，攻毒组通过肌注途径接种病毒，病毒接种量为 10^{4.5} ELD₅₀ (0.5 mL·羽⁻¹)；对照组雏番鸭肌注无菌 PBS 缓冲液，0.5 mL·羽⁻¹。各试验组动物进行隔离饲养，连续观察 14 d，每天观察各组动物的临床症状和死亡情况，对死亡鸭进行剖检观察病理变化，并采集胰腺和脾脏等进行病原鉴定。

1.7 衣壳蛋白基因的克隆与序列分析

1.7.1 目的基因的克隆 参照 GenBank 上发表的鸭 1 型甲肝病毒衣壳蛋白基因序列 (JX390982, GQ130377 及 DQ249299 等)，用 Primer premier 5.0 软件设计引物。上游引物 VP1F: 5'-GGT GATTCCAACCAGTTAGGGGAT-3'，下游引物 VP1R: 5'-TTCAATTTCCAGGTTGAGTTCA-3'，该对引物间的理论跨幅为 714 bp，由生工上海生物工程有限公司合成。参照 1.4.1 节的方法制备模板进行 PCR 扩增，反应体系 50 μL，反应体系为：10× Buffer 5 μL，dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 2μL，Fast PFU DNA polymerase (Transgen 公

司) 1 μL (2.5 U·μL⁻¹)，引物各 0.5 μL，模板 2 μL，用去离子水补充体积为 50 μL，反应条件与 1.3.2 节相同，取产物 5μL 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。将扩增产物经琼脂凝胶纯化回收后，将目的片段克隆进平端克隆载体 pEASY-Blunt，筛选阳性克隆送生工上海生物工程有限公司进行测序。

1.7.2 目的基因的序列分析 测序结果用 Lasergene V 7.1 DNASTar 软件进行编辑整理后，用 MEGA Version 4.1 软件将其与 GenBank 中登录的常见毒株的 VP1 基因序列进行同源性比较，并构建基于 VP1 蛋白氨基酸序列的 Neighboring-joining 遗传进化树，采用 Bootstrap1000 软件检验遗传进化树各分支的置信度。用于序列分析的毒株及其相关信息见表 1。

表 1 分析所用毒株相关信息
Table 1 Information of viral strains used in this study

| 名称 | 登录号 | 分离时间 /年 | 分离地 | 基因型 |
|------------------|-----------|------------|-----|--------|
| 90D | EF067924 | 2007 * | 中国 | DHAV-2 |
| 04G | EF067923 | 2006 * | 中国 | DHAV-2 |
| Du/CH/LJS/090905 | JF828996 | 2009 | 中国 | DHAV-3 |
| G | EU755009 | 1999 | 中国 | DHAV-3 |
| AP-03337 | DQ256132 | 2004 | 韩国 | DHAV-3 |
| AP-04114 | DQ812093 | 2003 | 韩国 | DHAV-3 |
| 5886 | DQ249301 | 2007 * | 中国 | DHAV-1 |
| FZ05 | JX390983 | 2005 | 中国 | DHAV-1 |
| R85952 | DQ226541 | 2005 * | 美国 | DHAV-1 |
| DRL62 | DQ219396 | 2005 * | 韩国 | DHAV-1 |
| FZ86 | JX390982 | 1986 | 中国 | DHAV-1 |
| ZJ | EU841005 | 2007 | 中国 | DHAV-1 |
| CL | EF427899 | 2007 * | 中国 | DHAV-1 |
| H | DQ249300 | 2005 * | 中国 | DHAV-1 |
| Du/CH/LGD/111238 | JQ804521 | 2011 | 中国 | DHAV-1 |
| Du/CH/LGD/111239 | JQ804522 | 2011 | 中国 | DHAV-1 |
| 03D | DQ249299 | 2005 * | 中国 | DHAV-1 |
| NA | GQ130377 | 2008 | 中国 | DHAV-1 |
| FZ99 | JX390984 | 1999 | 中国 | DHAV-1 |
| MY | GU9446771 | 2006 | 中国 | DHAV-1 |
| X | JQ316452 | 2011 * | 中国 | DHAV-1 |
| A66 | DQ886445 | 2007 * | 中国 | DHAV-1 |
| C80 | DQ864514 | 2006 * | 中国 | DHAV-1 |

注：* 基因序列提交时间。

2 结果与分析

2.1 临床病料的病毒检测

根据已报道的鸭主要常见病毒检测方法对采集的表现胰腺发黄或出血的样品进行病原检测,结果

在样品中检测到 DHV-1 阳性,扩增产物大小为 199 bp,其他病毒检测为阴性,检测结果见图 1。PCR 扩增产物测序结果表明,该序列与 GenBank 数据中鸭 I 型甲型肝炎病毒 Du/CH/LGD/111239 株的同源性最高。

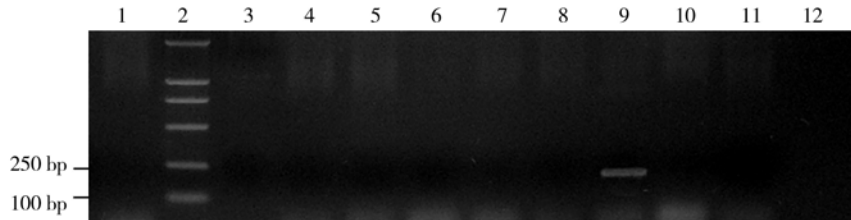


图 1 临床样品病原的检测

Fig. 1 Detection of infectious agent from clinical samples

1 为阴性对照; 2 为 DNA 分子量标准; 3 为番鸭细小病毒; 4 为小鹅瘟病毒; 5 为产蛋下降综合征病毒; 6 为鸭瘟病毒; 7 为禽流感病毒; 8 为新城疫病毒; 9 为鸭 I 型甲肝病毒; 10 为鸭 3 型甲肝病毒; 11 为鸭呼肠孤病毒; 12 为鸭坦布苏病毒

2.2 病毒的分离、纯化

为进一步分析该病例,将采集的病料无菌接种无母源抗体的 11 日龄番鸭胚,接种后 48h 导致番鸭胚死亡。无菌回收死胚的含毒尿囊液,按常规方法^[22]分别在 37℃ 和 4℃ 下测定分离病毒对鸡红细胞、鸭红细胞、绵羊红细胞的血凝活性,结果表明,分离病毒在 2 种温度下均不凝集 3 种红细胞。所获得病毒经 3 轮蚀斑筛选后获得了纯化病毒,经 RT-PCR 检测为 DHAV-1。

2.3 鸭胚中和试验

按固定血清稀释病毒法,运用 Reed-Muench 法计算病毒中和组的 ELD_{50} 为 $10^{-2.32} \cdot (0.1 \text{ mL})^{-1}$,病毒对照组的 ELD_{50} 为 $10^{-5.37} \cdot (0.1 \text{ mL})^{-1}$,计算血清的中和指数为 $10^{3.05}$ ($10^{3.05} = 1122$),中和指数表明所分离病毒能被鸭 I 型甲型肝炎病毒高免血清特异性中和。

2.4 雏番鸭致病性试验

7 日龄雏番鸭接种毒株 MPZJ1206 后,初期表现为食欲减退、趴伏静卧,并伴有拉稀的现象,随后发病鸭表现出明显的沉郁现象,60 h 后开始出现死亡,剖检病死番鸭主要可见胰腺泛黄,肝脏稍肿大,但出血不明显,120 h 死亡的番鸭剖检测表现为胰腺出血、坏死,肝脏部分肿大,仍未见出血。这与该病的临床表现十分类似。14 d 后攻毒组番鸭共死亡 5 羽,死亡率达到 38.5%。采集发病鸭的胰腺和肝脏,参照 1.3 节的方法鉴定为

DHV-1。

2.5 衣壳蛋白基因的分子特征分析

本试验以 DHAV-1 VP1 基因的特异性引物从表现胰腺发黄病毒分离株 MPZJ1206 基因组中扩增出 700 bp 的条带,其大小均与预期扩增产物大小相同。测序结果表明,所获得的基因大小均为 714bp,编码 238 个氨基酸。病毒 MPZJ1206 株与 GenBank 中登录的 DHAV-1 的 VP1 基因核苷酸同源性介于 94.1%~99.1%,其中与同时期分离的经典 DHAV-1 毒株 (Du/CH/LGD/111239) 同源性最高,核苷酸同源性达到 99.1%;而与 DHAV-2 和 DHAV-3 毒株的 V 基因的核苷酸同源性仅分别为 68% 和 71% 左右。VP1 基因推导氨基酸序列比对分析表明,MPZJ1206 株病毒与 DHAV-1 的 VP1 基因推导氨基酸残基的同源性为 96.8%~97.5%,与时期经典 DHAV-1 分离株的同源性最高,而与 DHAV-2 和 DHAV-3 毒株的 V 基因推导氨基酸序列同源性仅分别在 71.2% 之间和 76.5% 左右,这些差异主要分布在蛋白的 3 个高变区 (48~59 aa; 140~155 aa 及 179~223 aa,见图 2)。遗传进化关系分析表明,MPZJ1206 株病毒与近年来分离的经典 DHAV-1 分离株 (如 Du/CH/LGD/111239 株和 NA 株) 共同构成了一个进化谱系,并与 R85952 等毒株同处于 DHAV-1 进化分支 (见图 3)。

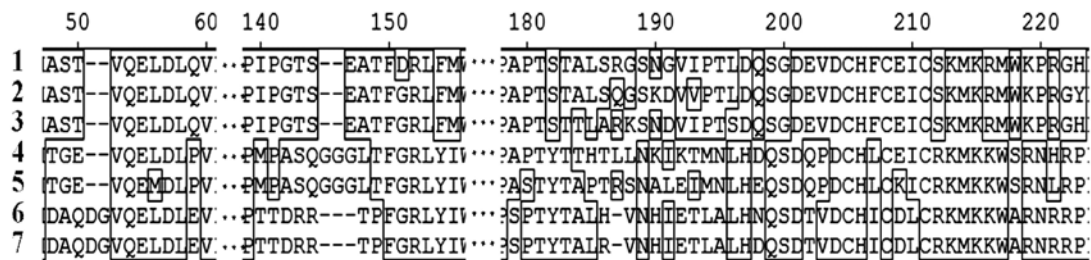


图 2 VP1 蛋白高变区氨基酸序列比对分析

Fig. 2 sequences analysis of hypervariable region on peptide of VP1 protein

注：1 为 MPZJ1206 毒株；2 为 Du/CH/LGD/111239 毒株；3 为 NA 毒株；4 为 G 毒株；5 为 AP04114 毒株；6 为 04G 毒株；7 为 90D 毒株。

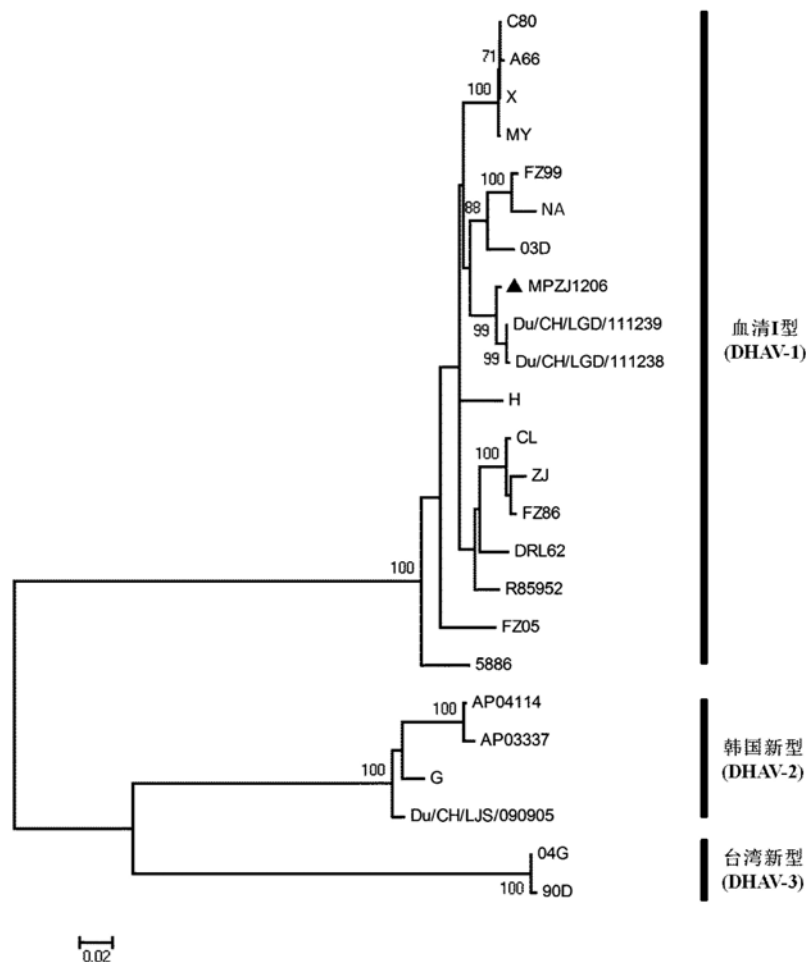


图 3 鸭甲肝病毒 VP1 基因遗传进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of VP1 gene of DHAV

注：图中树结处的阿拉伯数字为自举检验置信值（1 000 个复制序列），低于 70 的数值未显示；黑三角（▲）标注的毒株为本实验的毒株

3 讨 论

鸭 1 型甲肝病毒（DHAV-1）是鸭甲肝病毒中的一种，严重危害染 3 周龄内的雏鸭，其致病型为病死前多呈角弓反张样神经症状，病死鸭剖解以肝

脏和肾脏肿大、出血为主要特征^[2]。2011 年 9 月以来，我国福建、浙江和上海等省市的部分 10～30 日龄雏番鸭发生以胰腺发黄或出血为特征的疫病，樱桃谷鸭、麻鸭等其他品种鸭未见发生该病。经病原学检测表明，所检测的 10 种病原中仅鸭 1

型甲肝病毒阳性, 随后的病毒分离鉴定、鸭胚中和试验、雏番鸭感染试验和 VP1 基因序列分析结果均表明, 导致雏番鸭发生胰腺炎并死亡的病例是由 DHAV-1 感染所致, 这一新病型有别于经典 DHAV-1 病毒感染雏鸭后形成的出血性肝炎病型, 为区别两者, 建议定为胰腺型肝炎, 其病原定为胰腺型鸭甲肝病毒。相类似, 2005 年 Guérin 等报道了一例由 DHAV-1 感染引起雏番鸭发生胰腺炎和脑炎的病例^[16]。

VP1 蛋白是 DHAV 结构蛋白, 位于病毒衣壳的表面, 包含主要的抗原决定簇, 能诱导宿主产生中和抗体, 也是抗原性的高度可变区, 因此 VP1 基因及其编码蛋白与病毒基因型和血清型密切相关, 分析 VP1 基因尤其是高变区的分子特征对分析 DHAV 分子进化规律、疫病的流行特征、疫苗的筛选以及诊断抗原的研制具有重要的指导意义^[2]。本试验对表现胰腺炎型致病型的 MPZJ1206 分离株 VP1 基因进行测定分析表明, 其核酸序列及推导氨基酸序列与近期 DHAV-1 分离的表现肝炎致病型的毒株 (如 Du/CH/LGD/111239 株和 NA 株) 的同源性均非常高, 分子系统进化分析表明均属于 DHAV-1 基因型谱系的毒株。

参考文献:

- [1] KNOWLES N J, HOVI T, HYYPIA T, et al. Family Picornaviridae. In *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al, Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 855—880.
- [2] SAIF Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 376—389.
- [3] 彭小微, 徐永亮, 王笑言, 等. 鸭甲肝病毒 VP1 基因的克隆和序列分析 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45 (9): 18—19.
- [4] LIU G Q, WANG F, NI Z, et al. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) isolates from southeast China is related to isolate attenuation [J]. *Virus Research*, 2008 (11): 1—5.
- [5] FU Y, PAN M, WANG X, et al. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings [J]. *J Gen Virol*. 2009, 90 (5): 1104—1108.
- [6] WANG L, PAN M, FU Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis [J]. *Virus Genes*, 2008, 37: 52—59.
- [7] http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.08_DVH.pdf
- [8] DING C, ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1 [J]. *Virology*, 2007, 361: 9—17.
- [9] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus in the family Picornaviridae [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87: 3307—3316.
- [10] TSENG C H, KNOWLES N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. *Virus Res*, 2007, 123: 190—203.
- [11] TSENG C H, TSAI H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus [J]. *Virus Res*, 2007, 126: 19—31.
- [12] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus revealed the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strain [J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 2059—2072.
- [13] FU Y, PAN M, WANG XY, et al. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 131 (3/4): 247—257.
- [14] 苏敬良, 黄瑜, 贺荣莲, 等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32 (1): 15—16.
- [15] 施少华, 程龙飞, 江斌, 等. 韩国型鸭肝炎病毒福建株的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42 (12): 9—12.
- [16] GUERIN J L, ALBARIC O, NOUTARY V, et al. A duck hepatitis virus type I is agent of pancreatitis and encephalitis in Muscovy duckling. In: *Proceedings of the 147th American Veterinary Medicine Association/50th American Association of Avian Pathologists Conference*, 14—18 July 2007, Washington, DC, USA, Abs 4585.
- [17] 刘友生, 彭春香, 傅光华, 等. 2010~2011 年中国部分地区禽坦布苏病毒感染调查及分子变异分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, (1): 47—53.
- [18] PLUMMER P J, ALEFANTIS T, KAPLAN S, et al. Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction [J]. *Avian Disease*, 1998, 42 (3): 554—564.
- [19] 傅光华, 施少华, 程龙飞, 等. 种番鸭产蛋下降综合征病毒的分离及其 PCR 鉴定 [J]. 福建农业学报, 2007, 22 (1): 43—45.
- [20] 许秀梅, 苏敬良, 黄瑜, 等. 两株鸭源禽呼肠孤病毒 S3 基因序列分析 [J]. 中国兽医杂志, 2008, 44 (1): 12—14.
- [21] 宋永峰, 温纳相, 宋延华, 等. 应用 PCR 快速诊断番鸭细小病毒病和小鹅瘟 [J]. 动物医学进展, 2009, 30 (5): 49—52.
- [22] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 343—354.

(责任编辑: 翁志辉)