

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1082-1089; 4 September 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.013

致胰腺泛黄鸭 1 型甲肝病毒全基因组分子特征

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

福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350012

摘要:【目的】揭示致胰腺泛黄鸭 1 型甲肝病毒(duck hepatitis A virus 1, DHAV-1)全基因组的分子特征。【方法】运用 RT-PCR 技术, 扩增出致胰腺泛黄 DHAV-1 MPZJ1206 株全基因组序列, 并与鸭甲肝病毒参考毒株基因组序列进行比对分析。【结果】致胰腺泛黄 DHAV-1 MPZJ1206 株基因组全长为 7703 nt, (G + C)% 为 43.05%, 包含一个大的开放阅读框, 编码 2249 个氨基酸残基的多聚蛋白, 基因组结构与其他 DHAV-1 参考毒株一致。序列比对结果显示, MPZJ1206 株全基因组序列与 GenBank 数据库中 DHAV-1 参考毒株核苷酸序列同源性在 93.5% - 99.6% 之间, 氨基酸同源性在 97.9% - 99.6% 之间, 遗传距离均低于 7%; 分子系统进化分析显示与 2011 年分离的 2 株 DHAV-1 (Du/CH/LGD/111238 和 Du/CH/LGD/111239) 亲缘关系最近。【结论】尽管 MPZJ1206 毒株感染雏番鸭引起的临床病变与传统 DHAV-1 差异明显, 但其基因组分子特征与传统的 DHAV-1 毒株相似, 病毒致病型的改变可能与其组织嗜性改变相关。

关键词:鸭 1 型甲肝病毒, 胰腺炎, 分子特征

中图分类号:R37 **文章编号:**0001-6209(2014)09-1082-08

鸭甲肝病毒(duck hepatitis A virus, DHAV)是引起雏鸭病毒性肝炎的主要病原^[1], 是小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*) 禽肝病毒属(*Avihepatovirus*)的成员^[2], 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^[3]。DHAV 包含 3 种基因型, 分别为 DHAV-1, DHAV-2 和 DHAV-3 型^[4-5]。DHAV-1 即为传统的血清 1 型鸭肝炎病毒(Duck hepatitis virus type 1, DHV-1)^[6-8], DHAV-2 和 DHAV-3 分别为近来报道的台湾新型^[9]和韩国新型^[10], 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^[11-13]。雏鸭感染鸭肝炎病毒后多呈现角弓反张临床症状, 剖检可见肝脏呈特征性肿大、出血, 出

现这种特征性的剖检病变是该病临床诊断的最重要依据^[3]。

2005 年 Guérin 等自表现脑炎和胰腺泛黄的番鸭中分离到鸭 1 型甲肝病毒, 发病鸭肝脏无明显的病变, 这表明鸭 1 型甲肝病毒感染还可引起雏鸭出现以脑炎或胰腺炎等病变为主要临床特征的新致病型^[14]。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泛黄、出血(俗称胰腺炎)为特征的疫病, 其发病率 10% - 30%, 病死率 25% - 40%, 经病原学研究确定其病原为鸭 1 型甲肝病毒^[15]。通过雏番鸭人工感染试验进一步证实该病毒所致病变不同于典型的鸭 1 型甲肝病毒, 而引起雏番鸭胰腺泛黄、出血等病变, 却

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-43);福建省种业创新专项(2011FJZY-9);福建省农科院院“双百”行动项目(Sbmx1302-2)

* 通信作者。E-mail: huangyu_815@163.com

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

收稿日期:2013-12-03; **修回日期:**2014-02-22

无典型的角弓反张等神经症状及肝脏出血的肉眼病变, 该病毒活性可被传统 DHAV-1 抗血清有效中和, 结构蛋白 VP1 基因与 GenBank 中登录的 DHAV-1 的 VP1 基因序列同源性介于 94.1% - 99.1%^[15], 为此将该病毒暂称为胰腺类型鸭 1 型甲肝病毒, 以区别于传统的肝炎型鸭 1 型甲肝病毒。

目前, 关于鸭甲肝病毒基因组分子生物学信息报道较多^[16-20], 致胰腺泛黄鸭 1 型甲肝病毒基因组分子特征未见报道。本研究对分离自表现胰腺泛黄病例的 1 株鸭 1 型甲肝病毒进行全基因组分子特性及生物学信息分析, 将有助于深入开展该病毒的分子生物学特性、致病性及病毒致病型变异的分子机制研究。

1 材料和方法

1.1 病毒

MPZJ1206 株致胰腺泛黄鸭 1 型甲肝病毒^[15]由

福建省农科院畜牧兽医研究所禽病室分离、鉴定和保存, 非免疫鸭胚购自华南农大生物制品有限公司。

1.2 主要试剂

Trizol 抽提试剂购自 Life technologies 公司; pMD18-T 载体、AMV 反转录酶、琼脂凝胶回收试剂盒均购自大连 QIAGEN 公司, FastPfu DNA 聚合酶, 5 × FastPfu 缓冲液, dNTPs (10 mmol/L), pEASY-B 载体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank 上已发表的鸭 1 型甲肝病毒分离株全基因组序列: Du/CH/LGD/111239 株 (JQ804522)、A66 株 (DQ886445)、C80 株 (DQ864514)、FZ99 株 (JX390984)、FZ86 株 (JX390982)、ZJ 株 (EU841005)、CL 株 (EF427899), 通过序列比对分析, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 9 对覆盖整个病毒全基因组序列引物, 扩增片段间相互重叠。引物由上海生工生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1. 病毒全基因组扩增引物序列

Table 1. Primers for amplification of viral genome

fragment	primers used in this study (5'→3')		positions/nt *
	up	down	
NDHV 1	TTTGAAAGCGGGTGCAT	GTTGTGTCACCTGGTTGTAATCTCT	1-1238
NDHV 2	CAATTTCTYGTGTRGTGCCGGAG	GTTAACAATRGTRAGAATGATCTC	1202-2351
NDHV 3	CAGTTTACYGCCCACTCTAT	TGGCTTCCACCTCCTCTTCAT	2055-2753
NDHV 4	CTCTTCTTTCCACTCCCTGCTCC	TTCCACTTCTCCTGCTTGAT	2609-3507
NDHV 5	TTTGATTGAGGCAGGCAGGTT	GTTGTGCTCACAATRTAATC	3088-4336
NDHV 6	CAYAACAACCTCGYCCAAAACATCA	CTCTAACCCARGCCCTAAAT	4331-5243
NDHV 7	CCAGTCTAAKGTGAGGCCTT	TAGCCATRTCTTCAATCTTCA	5086-6173
NDHV 8	TGTCTATGAGGACTACCCTAT	TGTTTAAATGCTTCYGGTCCCTTGC	6091-7221
NDHV3E	CAGCYAGTGACAAAAGAAAGT	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	7053-3end
RTP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCT ₁₅		

* Primer positions were according to reference viruses FZ86 (JX390982) and CL (EF427899) genome; R = A/G; Y = C/T; B = C/G/T; K = G/T.

1.4 病毒基因组 RNA 提取及第一链合成

取新致病型鸭 1 型甲肝病毒 MPZJ1206 株冻存毒经尿囊腔途径接种 11 日龄非免疫鸭胚进行增殖后, 参照文献^[15]提供的方法进行病毒基因组 RNA 提取及第一链合成, 将获得的 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。

1.5 病毒基因组的 PCR 扩增

反应在 50 μL 体系中进行, 在 0.2 mL 反应管依次加入 5 × Fast Pfu Buffer 10 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 上下游引物 (20 pmol/μL) 各 1 μL, cDNA 2 μL, Fast Pfu DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.8 μL, 灭菌超纯水至 50 μL。PCR 反应条件为: 95℃ 5 min;

94℃ 40 s, 53 - 55℃ 40 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 结束反应。取 PCR 产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳观察 PCR 结果。

1.6 扩增片段的克隆测定

按照 QIAGEN 公司胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。纯化后产物按 pEASY-Blunt 载体说明书进行连接, 取 5 μL 连接产物转化至 DH5α 大肠杆菌, 涂氨苄 LB 平板培养过夜, 在氨苄 LB 平板上挑取白色菌落至液体氨苄 LB 培养基中培养, 用菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 阳性克隆送至上海生物工程公司测序。应用 Lasergene 7.0 软件对 2 株毒株的基因片段测定结果进行拼接编辑。

1.7 基因同源性、遗传距离和系统进化分析

使用 Lasergene 7.0 软件包中 MegAlign 程序分析病毒基因组核酸序列及推导多聚蛋白的氨基酸序列同源性;采用 PHYLIP 软件包中的 DNADIST 程序 (Kimura 2-parameter 方法) 计算遗传距离;使用 MEGA 4.1 软件包中的 NJ 程序 (Neighbor-Joining 方法) 构建系统进化树,进化树的置信度由 Bootstrap 法检验,域值为 70%,共 1000 次循环。

2 结果

2.1 病毒全基因组序列测定

通过 RT-PCR 分段扩增出病毒全基因组序列片段,测序后利用 Lasergene 7.0 软件包中 seqman 程序进行编辑和拼接,最后获得了 MPZJ1206 株的全

基因组序列,基因组序列 GenBank 登录号为 KF924552。序列分析发现,病毒基因组全长为 7703 nt, (G + C)% 为 43.05%, 包含一个大小为 6750 nt 的开放阅读框 (ORF), 编码一个 2249 氨基酸 (Amino acid, aa) 的多聚蛋白,5' 末端非编码区 (5' UTR) 为 627 nt,3' UTR 为 326 nt, 包含一个 12 碱基序列的 PolyA 尾。比较 DHAV 病毒基因组 5' UTR 序列表明,MPZJ1206 与 DHAV-2(90D 株)和 DHAV-3 (AP-03337 株) 序列差异明显,序列同源性在 71.3% - 72.5% 之间,与其他 DHAV-1 分离株间的序列同源性在 96.2% - 99.7% 之间,差异位点主要分布在嘧啶富集区 (pyrimidine-rich region, 124 - 230 nt) (图 1-A) 和超螺旋结构域 Ie 区 (Domain Ie, 300 - 330nt) (图 1-B), 内部核糖体进入位点 (IRES) 序列区域 8 个核苷酸残基的差异。

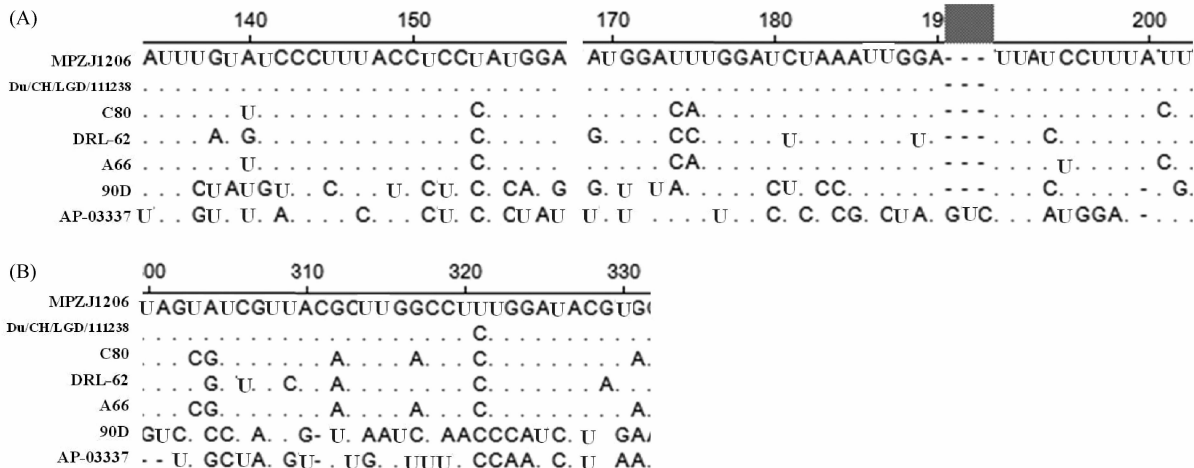


图 1. 鸭甲肝病毒 5' UTR 序列分析

Figure 1. sequence analysis of 5' UTR of duck hepatitis A virus.

将分离株所编码的多聚蛋白氨基酸与同科其他病毒多聚蛋白氨基酸进行比对分析发现,本病毒编码的多聚蛋白存在 11 个切割位点(表 2),在不同蛋白酶作用下产生 12 种蛋白(表 2)。MPZJ1206 毒株多聚蛋白的 N 端存在一个豆蔻酰基化识别位点,³¹ GAVES³⁵, 该位点的存在预示着该病毒可能存在一个短的引导蛋白(L 蛋白),在 2A 蛋白内部还发现了将 2A 蛋白切割成 2A1 和 2A2 蛋白的⁷⁴⁹ NPGP⁷⁵² 基序,但不存在将 VP0 切割为 VP4 和 VP2 的切割位点。病毒基因组编码的多聚蛋白中,结构蛋白 VP1 的差异最大,与 DHAV-1 其它参考毒株 VP1 的同源性在 95.8% - 97.5% 之间,其中 672 - 716aa (多聚蛋白氨基酸数) 为高变区,而 2A1、3C、3D 等蛋白较

为保守。

2.2 同源性及遗传距离

将 MPZJ1206 株与 GenBank 已发布的 26 株鸭 1 型甲肝病毒、2 株 DHAV-1 及 6 株 DHAV-3 进行全基因组序列比较(表 3)。结果表明 MPZJ1206 株与 DHAV-1 参考株全长核苷酸序列同源性在 93.5% - 96.6% 之间,多聚蛋白氨基酸序列同源性在 97.9% - 99.6% 之间,遗传距离 (genetic distance, GD) 均在 7% 以下,与 2011 年分离的 Du/CH/LGD/111238 (JQ804521) 和 Du/CH/LGD/111239 (JQ804522) 的同源性最高,全基因组核苷酸及推导氨基酸序列同源性均为 99.6%,遗传距离仅为 0.4%;与 DHAV-2 的病毒全基因核苷酸及推导氨基酸序列同源性分别

为 72.5% 和 82.1% - 82.3% 之间, 与 DHAV-3 的病毒核苷酸及氨基酸序列同源性分别为 73.1% - 73.4% 和 83.6% - 83.8% 之间, MPZJ1206 株与这 2 种基因型病毒的遗传距离均在 33% 以上(见表 3)。

表 2. 鸭甲肝病毒多聚蛋白序列同源性比对结果

Table 2. Information and homology analysis of polyprotein of duck hepatitis A viruses

protein	position (aa)	amino acid sequence in cleavage site	homology/%		
			DHAV-1	DHAV-2	DHAV-3
Polyprotein	1 - 2249	-	97.9 - 99.6	82.1 - 82.3	83.6 - 83.8
L	1 - 30	-	97.3 - 99.7	80.7 - 81.1	84.2 - 84.7
VP0	31 - 256	L/G	97.6 - 99.3	75.9 - 76.4	78.7 - 80.1
VP3	257 - 493	Q/G	98.5 - 99.2	78.4 - 78.9	79.6 - 80.4
VP1	494 - 731	Q/G	95.8 - 97.5	70.9 - 72.1	75.3 - 77.0
2A1	732 - 751	E/S	99.8 - 100	81.9 - 86.3	91.6 - 92.2
2A2	752 - 1036	G/P	98.1 - 99.5	62.7 - 63.2	65.9 - 66.7
2B	1037 - 1155	Q/S	97.5 - 100	92.3 - 93.0	91.8 - 92.7
2C	1156 - 1488	Q/S	98.9 - 100	92.7 - 93.1	92.7 - 94.2
3A	1489 - 1581	Q/S	98.4 - 100	73.7 - 75.0	74.3 - 76.4
3B	1582 - 1609	Q/S	97.8 - 100	76.4 - 77.6	80.1 - 84.3
3C	1610 - 1796	Q/S	99.3 - 100	92.1 - 93.6	90.4 - 91.1
3D	1797 - 2249	Q/G	98.7 - 99.5	88.0 - 88.7	89.3 - 89.7

表 3. 鸭甲肝病毒全基因组序列信息及与 MPZJ1206 毒株序列同源性

Table 3. Information and genomic homology analysis of duck hepatitis A viruses

strain name	GenBank ID	year	locations	genotype	alignment results /%		
					NT	AA	GD
G	EU755009	1999	Fujian, China (中国福建)	DHAV-3	73.1	83.7	33.5
AP-03337	DQ256132	2004	Korea (韩国)	DHAV-3	73.4	83.7	33.1
AP-04114	DQ812093	2003	Korea (韩国)	DHAV-3	73.4	83.8	33.1
SD02	GQ485311	2009	Shandong, China (中国山东)	DHAV-3	73.3	83.8	33.3
1v	GU250782	2009 *	China (中国)	DHAV-3	73.3	83.6	33.3
FS	EU877916	2008	Guangdong, China (中国广东)	DHAV-3	73.4	83.8	33
90D	EF067924	2006 *	China (中国)	DHAV-2	72.5	82.3	34.4
04G	EF067923	2006 *	China (中国)	DHAV-2	72.5	82.1	34.4
DRL-62	DQ219396	2005 *	Korea (韩国)	DHAV-1	95.3	98.9	4.9
5886	DQ249301	2005 *	China (中国)	DHAV-1	94.4	97.9	5.9
FZ05	JX390983	2005	Fujian, China (中国福建)	DHAV-1	93.5	97.9	6.9
YZ	EF427900	2007 *	China (中国)	DHAV-1	94.8	98.6	5.5
R85952	DQ226541	2005 *	USA (美国)	DHAV-1	95.5	98.9	4.6
HP-1	EF151312	2006 *	China (中国)	DHAV-1	95.3	98.4	4.9
FZ86	JX390982	1986	Fujian, China (中国福建)	DHAV-1	95.7	98.3	4.4
ZZ	EU395439	2008 *	Shandong, China (中国山东)	DHAV-1	95.3	98.4	4.9
Vaccine strain	EU395440	2008 *	China (中国)	DHAV-1	95.5	98.6	4.7
JH1	EU395436	2008 *	Shandong, China (中国山东)	DHAV-1	95.4	98.6	4.9
FS	EU395438	2008	Shandong, China (中国山东)	DHAV-1	95.4	98.5	4.8
GZ	EU888310	2003	Guangdong, China (中国广东)	DHAV-1	95.6	98.6	4.6
ZJ	EF382778	2007 *	Zhejiang (中国浙江)	DHAV-1	95.4	98.4	4.8
HDHV1ZJ	FJ157176	2008 *	Gansu (中国甘肃)	DHAV-1	95.3	98.2	4.9
CL	EF427899	2007 *	Shandong, China (中国山东)	DHAV-1	95.2	98.3	5.0
Du/CH/LGD/111238	JQ804521	2011	Heilongjiang, China (中国黑龙江)	DHAV-1	99.6	99.6	0.4
Du/CH/LGD/111239	JQ804522	2011	Heilongjiang, China (中国黑龙江)	DHAV-1	99.6	99.6	0.4
03D	DQ249299	2005 *	China (中国)	DHAV-1	96.6	99.4	3.2
FZ99	JX390984	1999	Fujian, China (中国福建)	DHAV-1	96.3	98.8	3.8
NA	GQ130377	2008	Fujian, China (中国福建)	DHAV-1	95.8	98.7	4.3
ZJ	EU841005	2007	Sichuan, China (中国四川)	DHAV-1	96.1	98.7	4.1
MY	GU9446771	2006	Sichuan, China (中国四川)	DHAV-1	96.1	98.6	4.0
C80	DQ864514	2006 *	China (中国)	DHAV-1	96.2	98.7	4.0
H	JQ301467	1993	Sichuan, China (中国四川)	DHAV-1	96.0	98.5	4.1
X	JQ316452	2011 *	Sichuan, China (中国四川)	DHAV-1	96.0	98.5	4.2
A66	DQ886445	2007 *	China (中国)	DHAV-1	96.0	98.4	4.1

NT stands for nucleotide; AA stands for amino acid; GD stands for genetic distance; * refers to the year sequences were submitted to GenBank database.

2.3 遗传进化分析

基于鸭甲肝病毒全基因组核苷酸序列的遗传进化分析表明,所有 DHAV-1 分离毒株在分子进化中分成 2 个大的进化分支 (group I 和 group II),各分支有包含 3 个小进化分支 (图 2)。本研究分离毒株 MPZJ1206 与 2011 年分离的 2 株 DHAV-1 构成一个小的进化分支,与 FZ99 及鸡胚传代弱化株 A66 及 C80 等参考毒株处于同一个大的进化分支 (group

II),而 CL 株、Vaccine strain 株及 DRL-62 等参考毒株则构成另外一个进化分支 (group I),各分离毒株间无明显地域或时间性差异,这与基于该病毒 VP1 基因的遗传进化分析结果类似^[15]。Group I 进化分支内各毒株间的平均遗传距离为 2.9%,Group II 进化分支内各毒株间的平均遗传距离为 3.1%,Group I 与 Group II 分支间的遗传距离为 4.7%。

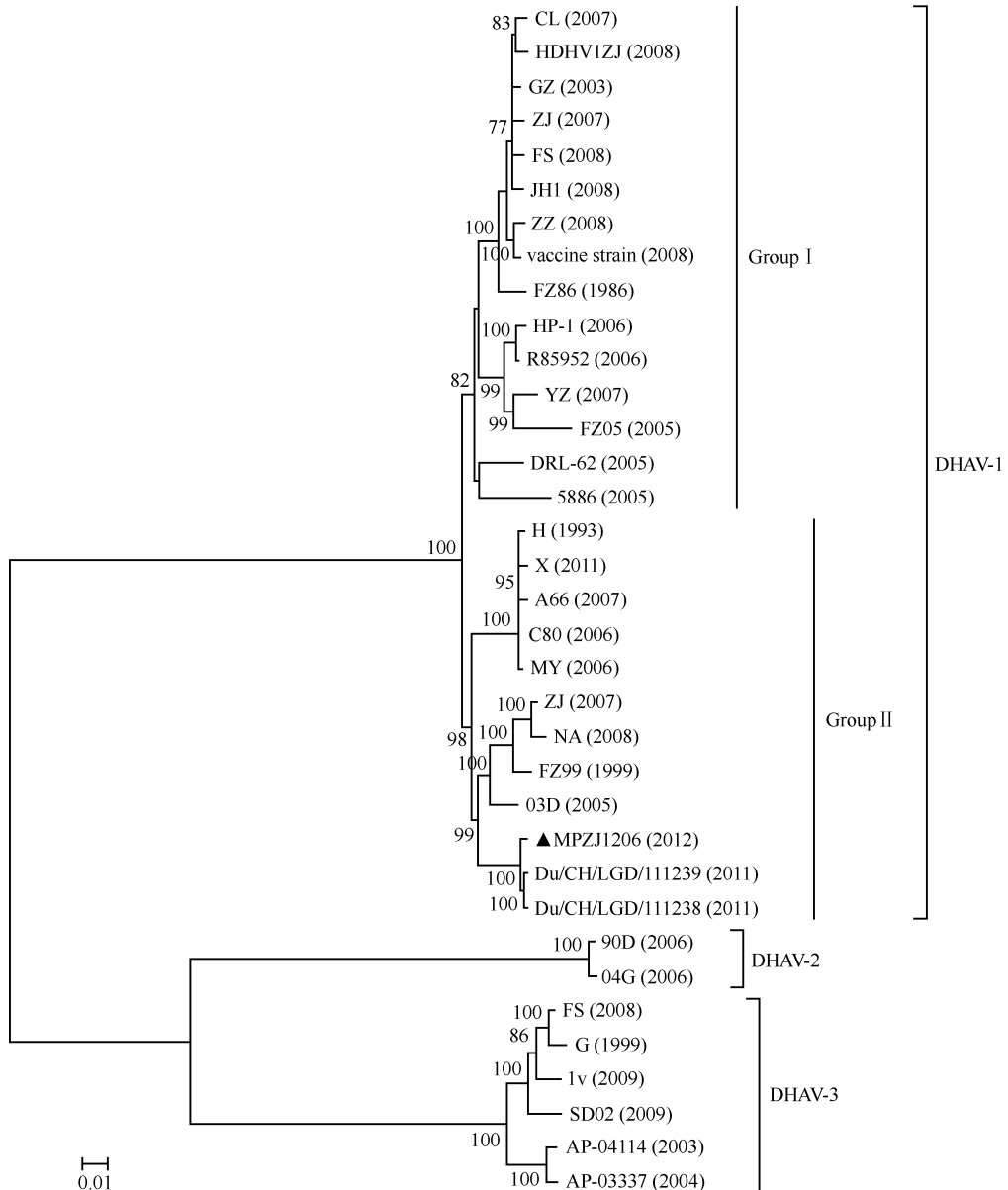


图 2. 鸭甲肝病毒基因组分子进化分析

Figure 2. molecular evolution of duck hepatitis A viruses. Virus marked with black triangle (▲) was isolated in this study; Arabia numbers on the tree node represented confidence values from bootstrap test (1000 replicates), value number less than 70 were dismissed.

3 讨论

鸭 1 型甲肝病毒是严重危害 3 周龄内雏鸭的鸭甲肝病毒中的一种, 主要侵染绿头鸭和樱桃谷鸭, 其主要特征是为病鸭死亡前神经症状明显, 多呈角弓反张, 病死鸭剖解以肝脏出血为主要特征^[3]。资料显示, Guérin 等于 2005 年报道了一例由 DHAV-1 感染引起雏番鸭发生胰腺炎和脑炎的病例^[14], 而后未见此类病例的报道。本实验的 DHAV-1 毒株 MPZJ1206 分离自表现胰腺泛黄的 11 日龄雏番鸭。临床发病和动物实验均证实该病毒感染雏番鸭后未导致肝脏呈现出出血病变或其他病理变化, 仅胰腺呈现乳黄色或土黄色, 有的表现为胰腺出血, 这与传统 DHAV-1 病毒感染雏鸭后形成的出血性肝炎病理型差异明显, 这是继 2005 年 Guérin 等后报道的第 2 例类似病例^[15]。本研究结果表明 MPZJ1206 与其他 DHAV-1 传统分离株之间全基因组序列同源性在 93.5% - 96.6% 之间, 不同 DHAV-1 分离毒株全基因组序列同源性很高, 然而毒株 MPZJ1206 感染雏番鸭引起的临床病变与传统毒株差异明显。值得关注的是 2011 年分离的 2 株病毒 (Du/CH/LGD/111238 和 Du/CH/LGD/111239) 与 MPZJ1206 株全基因组序列同源性高达 99.6%, 因未见其分离鉴定报道, 尚不清楚这 2 株病毒感染雏鸭引起的临床病变主要是肝脏肿大出血, 还是与 MPZJ1206 毒株一样引起胰腺泛黄的病变。新致病型的出现无疑会严重影响 DHAV-1 病例的临床诊断, 应尽早建立该病的特异性快速鉴别诊断技术。病毒基因组序列分析表明, MPZJ1206 毒株与其他鸭 1 型甲肝病毒全基因组序列差异主要分布于结构蛋白 VP1 编码基因^[15]及其 5' UTR 序列, 因此基于这 2 个区域基因序列建立致胰腺炎型和肝炎型 DHAV-1 毒株的快速检测技术及鉴别诊断技术将有助于该病的分子遗传变异监测及流行病学调查, 及时掌握流行毒株的分子生物学特性, 这将为该病的有效预防和控制措施提供科学依据。

目前还不清楚导致毒株 MPZJ1206 感染雏番鸭造成的临床病变与传统分离毒株出现差异的分子基础。血清学试验表明 MPZJ1206 毒株可被传统病毒的抗血清有效中和^[15], 而且该病毒基因组与其他 DHAV-1 参考毒株的基因组同源性在 93.5% -

96.6% 之间, 有的甚至高达 99.6%, 但 VP1 蛋白基因及 5' UTR 差异较明显。VP1 蛋白是 DHAV 结构蛋白, 位于病毒衣壳的表面, 参与病毒入侵宿主细胞过程, 即 VP1 蛋白在病毒与宿主相互作用过程中发挥重要作用, 可能也影响病毒的组织嗜性^[22]。DHAV-1 病毒基因组 5' UTR 包含负责起始下游基因翻译的 IRES 元件及其他功能结构域^[23], 且资料显示, 微小核糖核酸 (RNA) 病毒科 (*picornaviridae*) 肠道病毒属 (*enterovirus*) 的脊髓灰质炎病毒基因组 5' UTR 的变异改变病毒的细胞和组织嗜性, 从而显著影响病毒对小鼠神经毒性^[21, 22]。因此同属微小核糖核酸病毒科的 DHAV-1 基因组 5' UTR 及 VP1 基因的变异也可能导致 DHAV-1 病毒的组织嗜性发生改变, 致使 DHAV-1 由嗜肝特性变为对胰腺亲嗜性更高, 从而引起感染雏番鸭出现胰腺泛黄的临床病变。

参考文献

- [1] Liu GQ, Wang F, Ni Z, Yun T, Yu B, Huang J, Chen J. Genetic diversity of the vp1 gene of duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) isolates from southeast china is related to isolate attenuation. *Virus Research*, 2008, 137(1), 137-141.
- [2] Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. Family Picornaviridae. // King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Et A. In virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012: 855-880.
- [3] Saif YM. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 第十一版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 376-389.
- [4] Wang L, Pan M, Fu Y, Zhang D. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*, 2008, 37: 52-59.
- [5] [Http://www. Oie. Int/Fileadmin/Home/Eng/Health _Standards/Tahm/2.03.08_Dvh. Pdf](http://www.oie.int/Fileadmin/Home/Eng/Health_Standards/Tahm/2.03.08_Dvh.Pdf)
- [6] Ding C, Zhang D. Molecular analysis of duck hepatitis virus 1. *Virology*, 2007, 361: 9-17.
- [7] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Lindberg AM, Kwon JH, Kim JH, Kim SJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus parechovirus In the family picornaviridae. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 3307-3316.

- [8] Tseng CH, Knowles NJ , Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, 123: 190-203.
- [9] Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Research*, 2007, 126: 19-31.
- [10] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Kim SJ, Tolf C, Kim JH, Sung HW, Lindberg AM, Kwon JH. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus revealed the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strain. *Archives Virology*, 2007, 152: 2059-2072.
- [11] Fu Y, Pan M, Wang X, Xu Y, Yang H, Zhang D. Molecular detection and typing of duck hepatitis a virus directly from clinical specimens. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(3-4):247-257.
- [12] Su JL, Huang Y, He RL, Zhao JX, Guo YP. Isolation and identification of novel duck hepatitis virus. *Chinese Journal of Veterinary Medicine Science and Technology*, 2002, 32(1):15-16. (in Chinese)
苏敬良,黄瑜,贺荣莲,赵继勋,郭玉璞. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定. *中国兽医科技*, 2002, 32(1): 15-16.
- [13] Shi S, Cheng L, Jiang B, Wan C, Fu G, Chen H, Lin F, Lin J, Su J, Huang Y. Isolation and identification of a South Korea-type duck hepatitis virus in Fujian province. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 42(12):9-12. (in chinese)
施少华,程龙飞,江斌,万春和,傅光华,陈红梅,林芳,林建生,苏敬良,黄瑜. 韩国型鸭肝炎病毒福建株的分离与鉴定. *畜牧与兽医*, 2010, 42(12):9-12.
- [14] Guérin JL, Noutary V, Boissieu C, Albaric O, Wyers M. Viral pancreatitis and encephalitis of Muscovy ducklings. *Veterinary Record*, 2005, 157(11): 328-328.
- [15] Fu G, Chen H, Huang Y, Shi S, Peng C, Jiang B, Cheng L, Wan C, Fu Q, Lin J, Lin F. Identification and sequence analysis of duck hepatitis A virus type 1 isolated from Muscovy duckling with Pancreatitis. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2012, 27(9): 945-950. (in Chinese)
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. 雏番鸭胰腺型鸭1型甲肝病毒分离鉴定及 VP1 基因分析. *福建农业学报*, 2012, 27(9):945-950.
- [16] Luo Y, Zhang G, Chen J, Liao M, Xu X, Ren T, Zhang J, Luo K. Genomic analysis and establishment of diagnostic technology for Duck hepatitis virus type 1. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(9): 2835-2842. (in Chinese)
罗玉均,张桂红,陈建红,廖明,徐小芹,任涛,张济培,罗开健. 1型鸭肝炎病毒 R 株全基因组分析与检测技术的研究. *中国农业科学*, 2008, 41(9):2835-2842.
- [17] Ma X, Yu K, Wu J, Song M, Liao M, Xin C. Complete genome sequencing and variations analysis of seven isolated strains and one vaccine strain of duck hepatitis virus. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(8): 1209-1214. (in Chinese)
马秀丽,于可响,吴静,宋敏训,廖明,辛朝安. 7株鸭肝炎病毒分离株及疫苗株的全基因组序列测定与变异分析. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(8):1209-1214.
- [18] Shi S, Cheng L, Fu G, Chen H, Chen Z, Yang W, Su J, Huang Y. Genomic sequence of a new serotype duck hepatitis virus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 309-315. (in Chinese)
施少华,程龙飞,傅光华,陈红梅,陈珍,杨维星,苏敬良,黄瑜. 鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析. *微生物学报*, 2009, 49(3):309-315.
- [19] Pan M, Fu Y, Wang X, Xu Y, Wen N, Wang LY, Zhang D. Isolation and identification of duck hepatitis C virus. *Chinese Journal of veterinary medicine*, 2009, 45(3): 13-14. (in chinese)
潘梦,付余,王笑言,徐永亮,温纳相,王丽艳,张大丙. 基因 C 型鸭肝炎病毒的分离和鉴定. *中国兽医杂志*, 2009, 45(3):13-14.
- [20] Yang W, Shi S, Chen H, Wan C, Cheng L, Fu G, Lin F, Lin J, Su J, Huang Y. Genomic sequence analysis of three strains of duck hepatitis virus type 1. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(14): 8-12. (in chinese)
杨维星,施少华,陈红梅,万春和,程龙飞,傅光华,林芳,林建生,苏敬良,黄瑜. 3株鸭肝炎病毒1型全基因组序列分析. *中国农学通报*, 2010, 26(14):8-12.
- [21] Kauder SE, Racaniello VR. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(12): 1743-1753.

- [22] Skip Virgin. Pathogenesis of viral infection. //Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Et Al, Editors. Fields virology. 5th eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 328 -389.
- [23] Ren L, Li J, Bi Y, Chen C, Zhang D, Liu W. Overview

on duck virus hepatitis A. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(7): 789-799. (in chinese)
任丽倩,李晶,毕玉海,陈璨,张大丙,刘文军. 鸭甲型病毒性肝炎的研究进展. *生物工程学报*,2012,28(7): 789-799.

Molecular characteristic of duck hepatitis A virus type 1 causing pancreatitis

Guanghua Fu, Yu Huang^{*}, Qiuling Fu, Longfei Cheng, Chunhe Wan, Shaohua Shi, Hongmei Chen, Jiansheng Lin, Fang Lin

Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian Province, China

Abstract: [**Objective**] We studied the molecular characteristics of the full-length genome of duck hepatitis A virus type 1 causing pancreatitis in Muscovy ducklings. [**Methods**] We determined the entire genomic sequence of duck hepatitis A virus type 1 strain MPZJ1206 using reverse transcription polymerase chain reaction assay and analyzed the bioinformatics of the viral genome sequence. [**Results**] The genome length of strain MPZJ1206 comprised 7703 bases, with a G + C content of 43.05%. The genome of MPZJ1206 contains a single, long open reading frame encoding a polypeptide of 2249 amino acids, with a genomic organization similar to those of other isolates of duck hepatitis A virus type 1. MPZJ1206 is identical with previously isolates by 93.5% - 99.6% in nucleotide sequence and 97.9% - 99.6% in amino acid sequence and shares genetic distance no more than 7%. Phylogenetic analysis based on genome sequence indicates that MPZJ1206 shares a close genetic relationship with two strains isolated in 2011. [**Conclusion**] Although pathotype caused by MPZJ1206 strain is significantly distinct from those induced by classical isolates of duck hepatitis A virus type 1, the genome of MPZJ1206 shares high homology with those of previous isolates. The change of pathotype may result from an alteration in viral tissue tropism of MPZJ1206.

Keywords: duck hepatitis A virus type 1, pancreatitis, molecular characteristic

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Found of China Agriculture Research System (CARS-43), by the New Century National Candidates of Millions of Talents Project of China (NCNCMTPC-2009) and by the Project of "Double-hundred" of Fujian Academy of Agricultural Science(Sbmx1302-2)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-87572396; E-mail: hangyu_815@163.com

Received: 3 December 2013/Revised: 22 February 2014