

## 鸭甲型病毒性肝炎的研究进展

任丽倩<sup>1,2</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 毕玉海<sup>2</sup>, 陈璨<sup>2</sup>, 张大丙<sup>3</sup>, 刘文军<sup>2</sup>

1 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国农业大学动物医学院, 北京 100193

任丽倩, 李晶, 毕玉海, 等. 鸭甲型病毒性肝炎的研究进展. 生物工程学报, 2012, 28(7): 789–799.

Ren LQ, Li J, Bi YH, et al. Overview on duck virus hepatitis A. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 789–799.

**摘 要:** 以下综述了鸭甲型肝炎病毒的命名与溯源、分子遗传与进化, 分析了鸭甲型病毒性肝炎的流行病学、临床特征及监测手段, 总结了国内外鸭甲型病毒性肝炎的研究现状, 进一步阐述了研究该病的必要性和紧迫性, 旨在为从事该领域的科研人员提供参考依据。

**关键词:** 鸭甲型肝炎病毒, 流行病学, 分子进化, 疫苗

## Overview on duck virus hepatitis A

Liqian Ren<sup>1,2</sup>, Jing Li<sup>2</sup>, Yuhai Bi<sup>2</sup>, Can Chen<sup>2</sup>, Dabing Zhang<sup>3</sup>, and Wenjun Liu<sup>2</sup>

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** This article describes the nomenclature, history and genetic evolution of duck hepatitis A virus, and updates the epidemiology, clinical symptom and surveillances of duck virus hepatitis A. It also summarizes the present status and progress of duck virus hepatitis A and illustrated the necessity and urgency of its research, which provides rationale for the control of duck hepatitis A virus disease in China.

**Keywords:** duck hepatitis A virus, epidemiology, molecular evolution, vaccine

**Received:** December 20, 2011; **Accepted:** March 5, 2012

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A215), Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201003012).

**Corresponding author:** Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; Fax: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A215), 公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 201003012) 资助。

鸭甲型病毒性肝炎 (Duck virus hepatitis A) 是危害雏鸭的一种急性、高致死性传染病, 具发病急、病程短、传播快、病死率高等特点, 主要侵害 3 周龄以内雏鸭, 严重威胁养鸭业健康发展。该病已出现并流行半个多世纪, 截至 2006 年, 研究人员测定出病毒的全基因组序列, 标志着国内外对该病的研究已进入一个崭新阶段。该病毒目前存在较多变异株, 国内外学者对其作了大量研究与分析。本文从鸭甲型病毒性肝炎的流行病学、分子遗传进化、基因组结构功能等方面入手, 阐述了鸭甲型病毒性肝炎常见的基因型及其临床特征, 最后分析出 GenBank 数据库中鸭甲型肝炎病毒的分子遗传与进化图谱, 并归纳出常见的监测方式与预防措施, 旨在为全面地分析该病毒特性、较好地预防该病发生提供直观的评价指标和方法, 为预防鸭甲型病毒性肝炎提供参考依据。

## 1 鸭甲型肝炎病毒的命名与溯源

目前, 鸭甲型病毒性肝炎由鸭甲型肝炎病毒 (DHAV) 引起。该病毒曾与鸭星状病毒 (DAstV) 统一被命名为鸭肝炎病毒 (DHV), 分 I、II、III 3 个血清型, 均属于小 RNA 病毒科。但根据 2005 年 7 月国际病毒分类委员会发表的最新病毒分类第八次报告, DHV-II 和 DHV-III 应归属于星状病毒科 (Astroviridae)<sup>[1]</sup>, 且更名为 DAstV-1、DAstV-2。

2007 年, Tseng 等<sup>[2]</sup>和 Kim 等<sup>[3]</sup>分别在台湾和韩国鉴定出与 DHV-I 无抗原相关性的新型; 2008 年, Wang 等<sup>[4]</sup>基于 VP1、VP0、VP3 基因序列及 3D 基因的部分序列将 DHV-I 分 A、B、C 三个基因型, 分别对应血清 I 型、台湾新型和

韩国新型。小 RNA 病毒科研究小组建议在小 RNA 病毒科中增设禽肝炎病毒属鸭甲型肝炎病毒种<sup>[5]</sup>, 并将血清型 DHV-I 的 3 个基因型归属其中。

本文将延用 2008 年后的分类, 将引起鸭甲型病毒性肝炎的病毒归属于小 RNA 病毒科的禽肝炎病毒属鸭甲型肝炎病毒种, 称之为鸭甲型肝炎病毒 (DHAV)。

## 2 鸭甲型病毒性肝炎的流行病学调查

鸭甲型病毒性肝炎自然爆发时, 主要侵害 3 周龄以内雏鸭, 死亡率可高达 90%~95%。该病无明显季节性, 病鸭和带毒鸭是主要传染源, 仅水平传播, 可通过消化道和呼吸道感染。易感鸭品种主要有樱桃谷、北京鸭、樱桃谷-北京杂、樱桃谷与其他品种鸭的杂交鸭、番鸭、半番鸭、浙江麻鸭、美国水鸭等。

DHAV-A 首次报道于 1945 年美国长岛。1954 年 Asplin 和 McLauch 从英国病鸭中分离到该病毒, 1957 年 Macpherson 和 Avery 在加拿大分离出 DHAV-A<sup>[6]</sup>。其后德国、意大利、印度、法国、苏联、匈牙利、日本等国相继报道了本病的流行。自印度、埃及分别报道了 DHAV-A 型的变异情况后, 美国 Sandhu 等 1992 年利用鸡胚中和试验发现 1 株 DHAV-A 的变异株与 DHAV-A 仅有单向交叉中和反应, 命名为 Ia 型<sup>[7]</sup>。

在我国, 鸭甲型病毒性肝炎最早出现在上海地区, 1980 年王平等<sup>[8]</sup>在北京地区分离到了该病毒, 1984 年郭玉璞等<sup>[9]</sup>用荧光抗体间接法确定病原为 DHAV-A。近几年, 国内学者不断从发病鸭中分离到 DHAV-A 的变异株: 陈建红

等<sup>[10]</sup>报道称珠江三角洲地区部分 DHAV 毒株的毒力与抗原性发生变异；苏敬良等<sup>[11]</sup>从北京和广西两地分离的 2 株毒株均与 DHAV-A 型阳性血清无交叉免疫反应，将其暂定为新型鸭肝炎病毒，基因组序列测定表明该毒株与 Kim 报道的韩国新型同源性最高<sup>[12]</sup>；郑献进等<sup>[13]</sup>报道了 DHAV-A 型变异株的存在；范书才等 1999 年从广东分离的 GD 株病毒在血清学和抗原相关基因上与 DHAV-A 不同，属新型<sup>[14]</sup>。为了解我国鸭甲型病毒性肝炎病毒的流行现状情况，袁率珍等<sup>[15]</sup>对 1999–2010 年从广东、山东、云南、河南和黑龙江等地发病死亡雏鸭分离得到 DHAV 分离株进行血清型鉴定与抗原相关 VP1 基因序列分析，结果表明目前 DHAV-A 和 DHAV-C 两种基因型同时流行。Fu 等<sup>[5]</sup>对 2001–2007 年分离自北京、内蒙古、重庆、广东、上海 5 个地区的 28 个样本基因序列进行分析，发现其中 13 株是 DHAV-A，15 株是 DHAV-C。何冉娅等<sup>[16]</sup>对 2007–2009 年华南地区各鸭场发病雏鸭进行病原学检测和 VP1 基因序列分析，结果显示危害华南地区的鸭甲型肝炎病毒已发生变异，且存在 DHAV-A、DHAV-C 两种基因型毒株的流行。此外，Liu 等<sup>[17]</sup>在临床表现为过度摄食、剖检以肝病变为主的病鹅体内也分离到了 DHAV-C 毒株。

### 3 鸭甲型病毒性肝炎的临床特征

#### 3.1 临床及病变特征

DHAV 潜伏期为 1~2 d，临床表现主要是全身性抽搐，运动失调，两脚痉挛，头向后仰呈角弓反张状，身体倒向一侧或就地旋转等神经症状；剖检病变主要出现于肝脏，表现为肿大、质

脆、色暗淡或发黄，表面有大小不等的出血斑或出血点。

#### 3.2 组织病理变化

病理变化出现严重的肝坏死、炎性细胞渗出及胆管上皮细胞增生，非化脓性脑炎等变化。伍莉等<sup>[18]</sup>用 DHAV-A 感染雏鸭发现攻毒后 12 h，肝、脾、肾及胰等器官组织以变性为主；攻毒后 24 h 呈现明显的坏死性病变；攻毒后 72~168 h，则出现较为明显的增生性病变。

#### 3.3 理化特征及生化指标

DHAV 呈球形或类球形，直径 20~40 nm，无囊膜，无血凝性，胞浆内繁殖。DHAV 耐酸 (pH 3.0)，耐热；对乙醚、氯仿、胰酶和常见消毒剂有抵抗力。

DHAV 感染雏鸭的血清生化指标表现为血清中葡萄糖、总蛋白、白蛋白含量及谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性的变化有一定规律性，且自由基参与鸭甲型病毒性肝炎的致病过程。

### 4 鸭甲型肝炎病毒的分子遗传与进化

GenBank 数据库中有 49 株 DHAV-A 全基因组序列，14 株 DHAV-C 全基因组序列。系统进化分析显示，DHAV-A 可分成两大支 (图 1)；毒株的进化规律与时间性和地域性没有明显的联系；不同地域、国家之间存在进化地位十分相近的病毒，例如 2007 年越南疫苗株 VXXT 与 94 年韩国株 DHV-HS、2005 年台湾株 5886 同在一个小分支，同源性分别为 99.2%、95.4%，后两者之间的同源性为 95.5%；2008 年我国分离株 LY0801 与 1995 年韩国株 DHV-HSS 处于姊妹进化分支，同源性为 94.3%；北京地区 F、JX 毒株

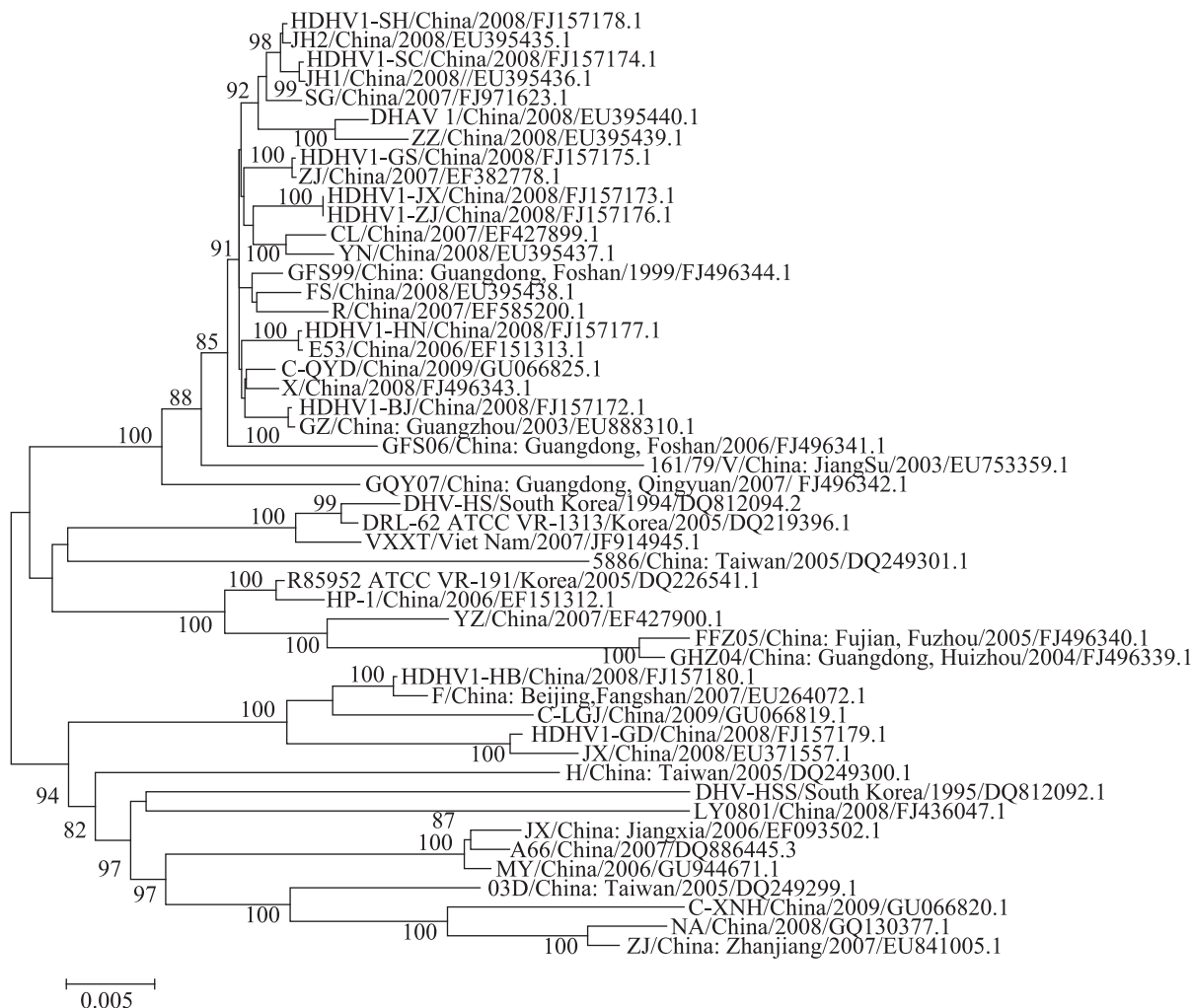


图 1 DHAV-A 基因型 49 株病毒全基因组系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of complete genome of DHAV-A.

与兰州兽医研究所分离的 HDHV1-HB、HDHV1-GD 毒株亲缘性较近，同源性分别为 95.8%~99.8%。结果表明 DHAV-A 有可能在相邻国家、地域间的鸭群中传播。

从 DHAV-C 型系统发育进化树 (图 2) 可知，韩国分离株进化地位接近并形成独立的一个小分支，中国分离株独自形成一个分支；1999 年分离株 GD 与 2008 年佛山分离株 FS 亲缘较近；2010

年 7 月刘明等自病鹅体内分离的毒株 JT 与广东分离株 C-GY 处于姊妹进化分支，两者之间同源性高达 99.4% (图 3)，进化树显示 DHAV-C 有扩大感染谱从鸭向鹅传播的趋势。另外，2008 年我国分离株 B63 与 2009 年越南株 DN2 独成一支，且全基因组序列比对也显示 DN2 和 B63 两毒株与其他毒株差异较大，两者之间差异最小，同源性达 96%。

		Percent identity															
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
	1		93.6	99.4	96.8	97.3	97.4	97.3	98.4	98.5	98.8	95.9	96.0	95.8	96.0	1	[DHAV3-JT]
	2	6.8		93.1	93.3	93.4	93.5	93.7	94.2	94.2	96.0	94.3	94.4	94.3	94.3	2	[DHAV3-DN2]
	3	0.6	6.3		97.4	97.8	97.9	97.8	98.9	99.0	95.4	96.4	96.5	96.3	96.5	3	[DHAV3-C-GY]
	4	3.2	7.1	2.7		98.2	97.6	96.5	97.5	97.5	94.2	95.1	95.1	95.0	95.1	4	[DHAV3-C-YCW]
	5	2.8	7.0	2.2	1.8		98.0	96.8	97.9	97.9	94.5	95.5	95.4	95.4	95.4	5	[DHAV3-C-YCZ]
	6	2.7	6.9	2.1	2.5	2.0		97.1	98.1	98.1	94.5	95.7	95.7	95.6	95.6	6	[DHAV3-C-YDF]
	7	2.8	6.7	2.3	3.6	3.3	3.0		98.0	97.9	94.6	95.8	95.9	95.6	95.8	7	[DHAV3-C-BLZ]
	8	1.6	6.1	1.1	2.5	2.1	1.9	2.0		99.3	95.3	96.6	96.6	96.4	96.6	8	[DHAV3-GD]
	9	1.5	6.1	1.0	2.6	2.1	1.9	2.1	0.7		95.4	96.6	96.6	96.5	96.6	9	[DHAV3-FS]
	10	5.4	4.1	4.9	6.1	5.8	5.7	5.6	4.9	4.8		96.1	95.9	95.9	96.0	10	[DHAV3-B63]
	11	4.2	6.0	3.7	5.1	4.7	4.5	4.3	3.5	3.5	4.1		98.7	99.1	99.3	11	[DHAV3-AP-04114]
	12	4.2	5.9	3.6	5.1	4.7	4.5	4.3	3.5	3.5	4.3	1.3		98.6	98.8	12	[DHAV3-AP-04009]
	13	4.4	6.1	3.8	5.3	4.8	4.6	4.6	3.7	3.6	4.3	0.9	1.4		99.3	13	[DHAV3-AP-04009]
	14	4.2	6.0	3.7	5.1	4.8	4.5	4.4	3.5	3.5	4.1	0.9	1.2	0.7		14	[DHAV3-AP-03337]
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

图2 DHAV-C 基因型核苷酸序列同源性分析

Fig. 2 Homology analysis of DHAV-C strains.

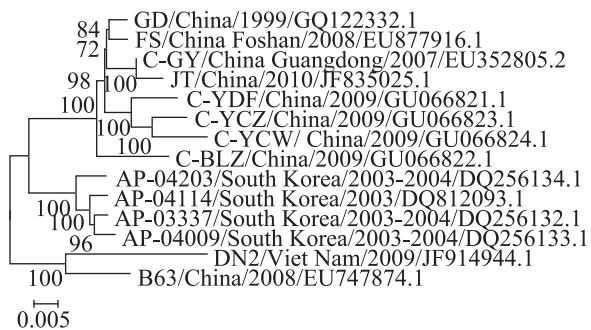


图3 DHAV-C 基因型 14 株病毒全基因组系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of complete genome of DHAV-C.

## 5 鸭甲型肝炎病毒的基因组结构与功能

基因组全序列测定显示 DHAV 基因组是一种单股正链 RNA 分子,由 5'非编码区 (5' UTR)、开放阅读框 (ORF)、3'非编码区 (3' UTR)和 ploy (A) 组成。到目前为止,研究人员所测基因组结构差异主要表现为是否存在 L 蛋白及 2A 蛋白的数目 (表 2)。

### 5.1 开放阅读框

开放阅读框 ORF 编码的多聚蛋白在病毒包

表 1 DHAV 基因组结构

Table 1 The genetic structure of DHAV

Genotype	Genome structure	Reference
DHAV-A	5'UTR- -VP0-VP3-VP1-2A1-2A2- -2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR	[19]
	5'UTR- -VP0-VP3-VP1-2A1-2A2- 2A3-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR	[20]
DHAV-C	5'UTR-L-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2- -2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR	[21]
	5'UTR- -VP0-VP3-VP1-2A1-2A2- 2A3 -2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR	[2]
	5'UTR-L-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2- -2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR	[12]

装过程中,先自我切割形成 P1、P2 和 P3 前体蛋白,再由自身编码的 3C 蛋白酶 ( $3C^{pro}$ ) 进行二级加工,最终被切割成 12 个成熟产物<sup>[22]</sup> (图 4)。

### 5.1.1 结构蛋白

在小 RNA 病毒中,结构蛋白 VP0、VP3 和

VP1 位于病毒壳体的表面,参与病毒抗原位点的形成。王丽艳等<sup>[24]</sup>发现 DHAV-A 结构蛋白均存在类似其他小 RNA 病毒的八链反向平行  $\beta$  桶结构,氨基酸序列差异主要位于连接  $\beta$  片层的环区,而这些区域在其他小 RNA 病毒中是主要免疫原。

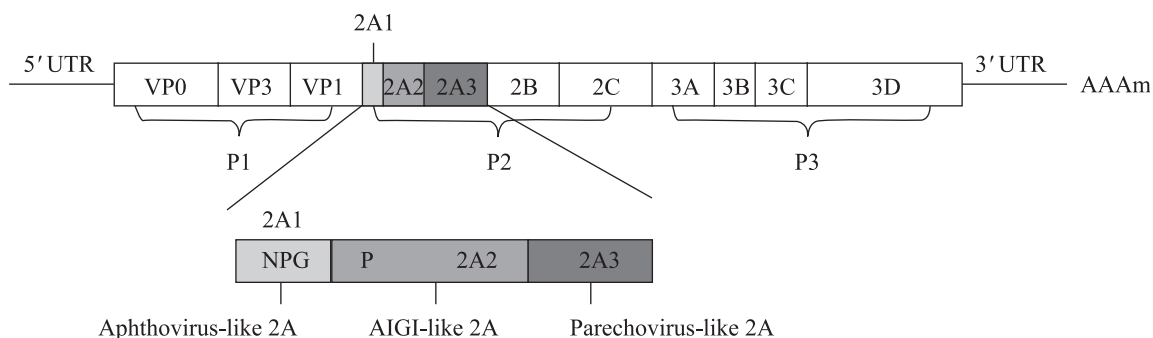


图 4 DHAV 基因组结构示意图<sup>[23]</sup>

Fig.4 The schematic diagram of genetic structure for DHAV<sup>[23]</sup>.

表 2 非结构蛋白的结构和功能

Table 2 The characteristics and functions of non-structural protein

Proteins	Structural characteristics	Function
2A2	The characters like GTPase family protein	Inhibit host cell growth
2A3		Associate with virus replication
2B		Concerned with infection spectrum through induce virus to adsorb on cell receptors
2C	Contains 3 conservative ATPase motifs	ATPase activity
3A		Associated with viral infection spectrum
3B	The 3rd amino acid residue is a conservative Try, and which is necessary for covalent binding to RNA	Promote viral RNA synthesis
3C	Conservative GxCG motif that is know as the active site in 3C protease of others of small RNA virus family	Play an important role in proteolysis
3D	Contains 8 conservative motifs of sense strand RNA virus and 5 feature motifs of RNA polymerase of small RNA virus family	As polymerase can catalyze viral RNA synthesis

近年研究发现在 DHAV-A 基因结构中 VP0 蛋白缺少被进一步水解成 VP4 和 VP2 的酶解位点<sup>[19-21]</sup>。刘燕等<sup>[25]</sup>最近研究发现 VP3 蛋白 N 端富含碱性氨基酸、约 20 aa 长的区域含有主要的抗原决定簇,能够诱导机体发生免疫反应。

在小 RNA 病毒中,VP1 蛋白作为主要的宿主保护蛋白,编码主要的抗原位点并具有主要的型特异性中和位点<sup>[26]</sup>,是决定病毒抗原性的主要成分。DHAV-C 与 DHAV-A 各基因的氨基酸序列比较得出结构基因以 VP1 的变异最为突出,源于 DHAV-C 的 VP1 较 DHAV-A 存在多个氨基酸的插入/缺失和位点突变。Jin 等<sup>[27]</sup>对 DHAV 的序列进行分析,提示 VP1 是主要的抗原位点;范卫国等<sup>[28]</sup>对其亲水性、表面可能性及抗原指数等参数进行分析,认为位于 VP1 蛋白分子表面的区段最可能是 B 细胞表位的优势区段,而该区段恰是其变异位点。

### 5.1.2 非结构蛋白

随着基因结构研究的深入,国内外学者对 DHAV 非结构蛋白的研究也取得了一定进展。

## 5.2 非编码区

DHAV 5'UTR 的 IRES 元件可起始下游蛋白的翻译,且不受真核起始因子 (eIF) 4F 活性的影响<sup>[29]</sup>。赵伟等<sup>[30]</sup>通过点突变发现颈环结构 SL1、SL2 和 IIIe 区是维持 IRES 启动内部翻译起始功能的关键性结构域。3'UTR 在小 RNA 病毒科中最长<sup>[31]</sup>;相比 DHAV-A, DHAV-C 3'UTR 的 5'末端存在一段约 50 nt 的插入序列,加上其他区域的插入缺失,使后者的 3'UTR 比前者长 51 nt~52 nt。poly (A) 是合成负链 RNA 的模板,其长度与负链 RNA 的合成效率及病毒 RNA 的感染能力有

关<sup>[32]</sup>。

## 6 鸭甲型肝炎病毒的诊断方法

临床上诊断鸭甲型病毒性肝炎应注意与鸭瘟、番鸭细小病毒、雏鸭副伤寒、禽霍乱等进行区分。

### 6.1 酶联免疫吸附试验 ELISA

随着单克隆抗体技术的成熟应用,ELISA 成为重要的检测方法之一。它简便、快速、特异性强,敏感性高,重复性好,但单抗的供应尚未商业化,使其推广受到了限制。马秀丽等<sup>[34]</sup>和 Liu 等<sup>[35]</sup>用 VP1 基因在大肠杆菌中表达,并以纯化的重组蛋白为抗原建立鸭甲型病毒性肝炎抗体检测 ELISA 法。

### 6.2 中和试验

中和试验是普遍认为的权威诊断方法,但其操作繁琐、费时、成本高,不便于快速诊断,不适于临床的推广应用。Kaleta<sup>[37]</sup>和陈琨等<sup>[38]</sup>分别利用 DHAV 及其阳性血清在鸭肾、鸭胚肝细胞单层上进行微量血清中和试验,用于病毒鉴定、疫病诊断和免疫监测,敏感性高于鸭胚中和试验。

### 6.3 其他方法

琼脂扩散试验简便易行、易于推广,但灵敏度不高且较易产生非特异性沉淀;凝胶试验特异、灵敏、简便、快速,但由于非特异性凝血因子影响及不同批次制备的红细胞在敏感性和稳定性方面存在波动,限制了 IHA 推广应用,早期建立的协同凝集试验为测定 DHAV 强弱毒株提供了一种简便易行的方法;PCR 操作简单、快速、特异性强、灵敏度高、易标准化,且可以检测病原体中特异性的核苷酸序列,多以 DHAV-A

3AB、3D、VP1 基因保守序列设计引物建立<sup>[39-40]</sup>, 目前已建立了 DHAV-A 和 DHAV-C 的鉴别 RT-PCR、DHAV-A 型巢式 PCR 和实时荧光定量 RT-PCR; 荧光抗体技术直观、快速、敏感性高, 可用于病原的检测和鉴定, 但费用和对设备的要求较高; 免疫胶体金检测技术简便、快速、灵敏、直观, 亦对设备的要求较高, 借此程安春等<sup>[39]</sup>观察到病毒形状; 免疫组织化学法可用于 DHAV 在感染雏鸭组织细胞中的亚细胞定位和动态分布、DHAV 感染雏鸭的实验室诊断、甲醛固定组织的回顾性诊断, 目前朱方伟等<sup>[41]</sup>观察到 DHAV-C 的动态分布特点。

## 7 鸭甲型肝炎的防治与展望

近年来, 鸭甲型病毒性肝炎的发生由 DHAV 引起, 我国控制该病应主要针对 DHAV 的 A 型和 C 型采取措施。目前预防和治疗 DHAV 的方法以高免卵黄抗体、高免血清、灭活苗、鸡胚化弱毒疫苗为主。其中, 高免卵黄抗体和血清对雏鸭被动免疫效果很好, 兔抗鸭甲型肝炎病毒高免血清鸡胚中和效价达 1:25 以上; 代长春<sup>[42]</sup>自制的卵黄抗体中和效价分别达 1:28、1:28.5 以上, 且均在感染强毒 24 h 以内对雏鸭进行肌肉注射治疗效果最为理想。但血清制备较繁杂, 成本高产量低, 不易满足生产需要, 高免卵黄抗体存在鸭群散毒及卵黄抗体携带强毒的潜在危险。临床上弱毒和灭活疫苗仍是预防该病最常用的方法, 培育的 DHAV-C 63 代鸡胚化弱毒疫苗对 1 日龄雏鸭安全无致病性, 免疫剂量为  $2.5 \times 10^{5.12}$  个 ELD<sub>50</sub>/只; 苏敬良等<sup>[43]</sup>获得的 DHAV-C 第 54 代弱毒具有良好的免疫原性、毒力稳定; Kim 等<sup>[44]</sup>用 SPF 鸡胚致弱的 DHAV-C 第 100 代弱毒

株接种 1 日龄雏鸭, 结果显示疫苗保护力较好, 毒力稳定。

虽然鸭甲型病毒性肝炎在全球出现并流行了半个多世纪, 近年来国内外学者多侧重于鸡胚致弱毒株的筛选和基因工程疫苗的研究, 但目前国内尚无规范化的鸭甲型病毒性肝炎疫苗。

## 8 小结

鸭甲型病毒性肝炎的流行给水禽养殖业带来了巨大损失和严重威胁。随着 2006 年 DHAV-A 全长基因组序列测定和报道后, 国内外对该病毒的研究进入一个崭新的阶段和领域, 从而开辟了 DHAV 分子生物学研究新方向, 推动了病毒分类、基因组结构与功能、病毒与宿主之间的相互作用、分子致病机理等的研究。目前, 我国 DHAV 及其变异株广泛流行, 迫切需要完善鸭甲型病毒性肝炎的流行病学资料, 以寻求更加快速、便捷的分子流行病学监测方法, 研制新型疫苗, 制定行之有效的标准化免疫诊断程序。

## REFERENCES

- [1] Todd D, Smyth VJ, Ball NW, et al. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathol*, 2009, 38(1): 21-29.
- [2] Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res*, 2007, 126(1/2): 19-31.
- [3] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno-and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Arch Virol*, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [4] Wang LY, Pan M, Fu Y, et al. Classification of



- duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*, 2008, 37(1): 52–59.
- [5] Fu Y, Pan M, Wang XY, et al. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Vet Microbiol*, 2008, 131(3/4): 247–257.
- [6] Macpherson LW, Avery RJ. Duck virus hepatitis in Canada. *Comp Med Vet Sci*, 1957, 21(2): 26–31.
- [7] Fan WG, Du JH, Cao RB, et al. Progress on duck hepatitis virus Type I. *Progr Vet Med*, 2009, 30(11): 110–114.  
范卫国, 杜佳慧, 曹瑞兵, 等. I 型鸭肝炎病毒概述. *动物医学进展*, 2009, 30(11): 110–114.
- [8] Wang P, Pan WS, Hu SW, et al. Duck virus hepatitis in peking duckling I. diagnosis and prevention. *Acta Sci Nat Univ Pek*, 1980(1): 55–74.  
王平, 潘文石, 胡寿文, 等. 北京小鸭病毒性肝炎的研究——(一)诊断和防治. *北京大学学报: 自然科学版*, 1980(1): 55–74.
- [9] Guo YP, Pan WS. Identification of Serotypes of Beijing duck virus hepatitis. *Chin J Vet Med*, 1984(11): 2–3.  
郭玉璞, 潘文石. 北京鸭病毒性肝炎血清型的初步鉴定. *中国兽医杂志*, 1984(11): 2–3.
- [10] Chen JH, Zhang JP, Si XK, et al. Development analysis of duck hepatitis epidemic and its future. *China Poultry*, 2001, 23(9): 40–42, 44.  
陈建红, 张济培, 司兴奎, 等. 鸭肝炎流行动态分析与展望. *中国家禽*, 2001, 23(9): 40–42, 44.
- [11] Su JL, Huang Y, He RL, et al. Isolation and identification of a new type of duck hepatitis virus. *Chin J Vet Sci Technol*, 2002, 32(1): 15–16.  
苏敬良, 黄瑜, 贺荣莲, 等. 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.
- [12] Shi SH, Su JL, Huang Y, et al. Genomic sequence of a new serotype duck hepatitis virus. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(3): 309–315.  
施少华, 苏敬良, 黄瑜等. 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.
- [13] Zheng XJ, Zhang DB, Qu F, et al. Identification of duck hepatitis virus II. *Chin J Vet Med*, 2006, 42(5): 15–16.  
郑献进, 张大丙, 曲丰发, 等. II 型鸭肝炎病毒变异株的鉴定. *中国兽医杂志*, 2006, 42(5): 15–16.
- [14] Fan SC, Li H, Yuan SZ, et al. Isolation and characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Chin J Prev Vet Med*, 2009, 31(10): 770–775.  
范书才, 李虹, 袁率珍, 等. 新型鸭肝炎病毒的分离鉴定. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(10): 770–775.
- [15] Yuan SZ, Fan SC, LI H, et al. Molecular characterization of duck hepatitis virus isolated in China. *Chin J Prev Vet Med*, 2010, 32(11): 849–853.  
袁率珍, 范书才, 李虹, 等. 鸭肝炎病毒分子流行病学分析. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(11): 849–853.
- [16] He RY, Yu M, Zhang YL, et al. Epidemiological investigation and genetic variation in *VP1* gene of duck hepatitis virus isolates from in southwestern China in 2007–2009. *Chin J Animal Infect Diseases*, 2010, 18(1): 7–15.  
何冉娅, 于淼, 张玉玲, 等. 2007 ~ 2009 年华南地区鸭肝炎病毒流行病学调查及分离株的 *VP1* 基因变异分析. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(1): 7–15.
- [17] Liu M, Fangyi M, Li X, et al. Goose haemorrhagic hepatitis caused by a new subtype duck hepatitis type I virus. *Vet Microbiol*, 2011, 152(3/4): 280–283.
- [18] Wu L, Zhu ZF. Observation of histological-pathology on experimental infected ducklings with duck hepatitis virus. *Chin J Vet Med*, 2011, 47(5): 29–30.  
伍莉, 朱周福. 雏鸭感染鸭病毒性肝炎的组织病理学观察. *中国兽医杂志*, 2011, 47(5): 29–30.
- [19] Kim MC, Kwon YK, Joh S, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a

- novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family *Picornaviridae*. *J Gen Virol*, 2006, 87(11): 3307–3316.
- [20] 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 Res*, 2007, 123(2): 190–203.
- [21] Ding CY, Zhang DB. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 2007, 361(1): 9–17.
- [22] Nie K, Hu YB, Zeng XY, et al. Bioinformatics analysis and prediction of polyprotein processing of duck hepatitis virus. *Chin J Prev Vet Med*, 2009, 31(6): 481–484.  
聂奎, 胡燕宾, 曾兴艳, 等. 鸭肝炎病毒基因的生物信息学分析及多聚蛋白的加工预测. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(6): 481–484.
- [23] Li C, Wei P, Tang LS, et al. Progress on the pathogeny speciality and the Relevant Precaution and Control of duck hepatitis virus I. *China Poultry*, 2008, 30(24): 43–47.  
李婵, 韦平, 唐林生, 等. I 型鸭病毒性肝炎的病原特性及防控研究进展. *中国家禽*, 2008, 30(24): 43–47.
- [24] Wang LY, Pan M, Fu Y, et al. Molecular characteristics of capsid proteins of duck hepatitis virus 1. *Chin J Vet Med*, 2008, 44(9): 3–6.  
王丽艳, 潘梦, 付余, 等. 1 型鸭肝炎病毒衣壳蛋白的分子特征. *中国兽医杂志*, 2008, 44(9): 3–6.
- [25] Liu Y, Pang AN, Wei Q, et al. Prokaryotic expression and antigenicity analysis of VP3 gene of Duck hepatitis virus I. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2011, 23(1): 66–69.  
刘燕, 庞安娜, 韦强, 等. I 型鸭肝炎病毒 VP3 基因的原核表达及其抗原性. *浙江农业学报*, 2011, 23(1): 66–69.
- [26] Balamurugan V, Renji R, Saha SN. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in *Pichia pastoris*. *Virus Res*, 2003, 92(2): 141–149.
- [27] Jin X, Zhang W, Zhang WP. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China. *Res Vet Sci*, 2008, 85(3): 595–598.
- [28] Fan WG, Du JH, Cao RB, et al. Prediction of the Gene Characterization and B Cell Epitopes of VP1 Protein in Duck hepatitis virus GD1. *Anim Husb Vet Med*, 2011, 43(1): 65–69.  
范卫国, 杜佳慧, 曹瑞兵, 等. 新型鸭肝炎病毒 GD1 株 VP1 结构蛋白的基因分析及 B 细胞抗原表位预测. *畜牧与兽医*, 2011, 43(1): 65–69.
- [29] Liu GQ, Yángüez E, Chen ZY, et al. The duck hepatitis virus 5'-UTR possesses HCV-like IRES activity that is independent of eIF4F complex and modulated by downstream coding sequences. *Virology*, 2011, 8(1): 147–158.
- [30] Zhao W, Li CF, Chen ZY, et al. The structure and function of internal ribosome entry site(IRES) in 5' UTR of duck hepatitis virus type I. *Chin J Prev Vet Med*, 2011, 33(1): 1–5.  
赵伟, 李传峰, 陈宗艳, 等. I 型鸭肝炎病毒内部核糖体进入位点的结构与功能研究. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(1): 1–5.
- [31] Lou H, Lü JL, Zhang YG. Progress on Structure and Function of Picornavirus 3'Untranslated Region. *Progr Vet Med*, 2011, 32(4): 86–90.  
娄慧, 吕建亮, 张永光. 小 RNA 病毒基因组 3' 非编码区结构与功能研究进展. *动物医学进展*, 2011, 32(4): 86–90.
- [32] Silvestri LS, Parilla JM, Morasco BJ, et al. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3'poly (A) tail. *Virology*, 2006, 345(2): 509–519.
- [33] Sun QY, Liu H, Li JS, et al. Study on the detection of antibodies against duck hepatitis virus by an indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Chin J Vet Sci*, 1997, 17(4): 347–349.  
孙泉云, 刘红, 李劲松, 等. 间接 ELISA 检测鸭肝炎病毒抗体的研究. *中国兽医学报*, 1997, 17(4): 347–349.
- [34] Ma XL, Song MX, Yu KX, et al. Expression of VP1 gene and ELISA detection of antibodies against duck hepatitis virus. *Acta Microbiol Sin*,

- 2008, 48(8): 1110-1114.  
马秀丽, 宋敏训, 于可响, 等. 鸭病毒性肝炎病毒 VP1 基因表达及其抗体检测 ELISA 方法的建立. 微生物学报, 2008, 48(8): 1110-1114.
- [35] Liu M, Zhang T, Zhang Y. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus. *Virology Methods*, 2010, 169(1): 66-69.
- [36] Ma XL, Song MX, Li F, et al. Dot-ELISA for detection of duck hepatitis virus. *Shandong Poultry*, 2004(9): 6-8.  
马秀丽, 宋敏训, 李峰, 等. Dot-ELISA 用于雏鸭病毒性肝炎的诊断. 山东家禽, 2004(9): 6-8.
- [37] Kaleta EF. Duck viral hepatitis type I vaccination: Monitoring of the immune response with a microneutralization test in Pekin duck embryo kidney cell cultures. *Avian Pathol*, 1988, 17(2): 325-332.
- [38] Chen K, Huang XM. A serum microneutralization test for duck hepatitis virus. *Chin J Vet Sci Technol*, 1996, 26(4): 21-23.  
陈琨, 黄新民. 病毒性肝炎病毒微量中和试验. 中国兽医杂志, 1996, 26(4): 21-23.
- [39] Cheng AC, Wu MS, Xin HY, et al. Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1. *J Microbiol Methods*, 2009, 76(1): 1-5.
- [40] Yang M, Cheng A, Wang M, et al. Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1. *J Virol Methods*, 2008, 153(1): 55-60.
- [41] Zhu FW, Gu CQ, Cheng GF, et al. Dynamic distribution of new type duck hepatitis virus in experimental infectious duckling. *J Huazhong Agri Univ*, 2007, 26(8): 511-513.  
朱方伟, 谷长勤, 程国富, 等. 新型鸭肝炎病毒感染雏鸭组织内病毒抗原的分布. 华中农业大学学报, 2007, 26(8): 511-513.
- [42] Dai CC. Development of high immunized vitelline antibodies against duck viral hepatitis. *China Poultry*, 2007, 29(9): 34-36.  
代长春. 鸭病毒性肝炎高免卵黄抗体的研制. 中国家禽, 2007, 29(9): 34-36.
- [43] Su JL, Zhang GZ, Huang Y, et al. Development of attenuated duck hepatitis A virus serotype 3 strain and evaluation of its antigenicity. *Chin J Vet Med*, 2009, 45(12): 11-14.  
苏敬良, 张国中, 黄瑜, 等. 血清 3 型鸭甲型肝炎病毒弱毒疫苗株培育及免疫原性研究. 中国兽医杂志, 2009, 45(12): 11-14.
- [44] Kim MC, Kima MJ, Kwon YK, et al. Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine*, 2009, 27(8): 1-7.