

## 研究报告

# 一株新型鸭细小病毒的分离鉴定和遗传演化特征分析

李丹<sup>1,2</sup>, 杨宵玥<sup>2</sup>, 宋亚芬<sup>2</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 张兵<sup>2</sup>, 徐守振<sup>\*1</sup>, 杨承槐<sup>\*2</sup>

1 青岛农业大学 动物医学院, 山东 青岛 266109

2 中国兽医药品监察所, 北京 100081

李丹, 杨宵玥, 宋亚芬, 张敏, 张兵, 徐守振, 杨承槐. 一株新型鸭细小病毒的分离鉴定和遗传演化特征分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 848-858.

LI Dan, YANG Xiaoyue, SONG Yafen, ZHANG Min, ZHANG Bing, XU Shouzhen, YANG Chenghuai. Isolation, identification, and phylogenetic characterization of a strain of novel duck parvovirus[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 848-858.

**摘要:**【背景】2015年以来,我国东部沿海地区陆续暴发樱桃谷鸭等商品肉鸭以短喙、舌外伸肿大、生长发育不良、腿骨易折等为主要临床症状的疾病,并逐步向内陆蔓延,研究发现引起该病的病原为新型鸭细小病毒(novel duck parvovirus, NDPV)。【目的】开展流行病学调查,研究 NDPV 的遗传进化特征,为了解 NDPV 遗传演化规律,完善 NDPV 流行病学数据及致病机制的研究提供科学依据。【方法】取发病雏鸭的肝脏研磨、离心后取上清,使用 SPF 鸭胚成功分离病毒并测其含量,对分离的病毒进行 PCR 鉴定及外源病毒检测,扩增病毒全基因组并进行序列同源性分析,对 VP1 蛋白进行分子特征和遗传进化分析。【结果】从山东省某鸭场疑似短喙侏儒综合征(short beak and dwarfism syndrome, SBDS)的病料中分离到一株 NDPV,命名为 SDGT0628。该分离株在 SPF 鸭胚上培养可导致鸭胚出现特异性死亡,测得鸭胚半数致死量( $DEL_{50}$ )为  $10^{-4.5}/0.2$  mL。全基因组核苷酸序列和 VP1 蛋白氨基酸序列同源性分析结果发现:分离株 SDGT0628 与 2023 年分离株 TX2302 全基因组核苷酸序列相似性最高为 99.8%,与 SD0101 和 LYG23 的核苷酸同源性次之,为 99.7%,VP1 蛋白氨基酸序列与 2018 年分离株 SD0101 相似性为 99.9%;SDGT0628 与鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)的同源性较番鸭细小病毒(muscovy duck parvovirus, MDPV)高。全基因组核苷酸序列系统发育树表明,SDGT0628 与 NDPV 形成一个小分支,证明 GPV 在不断地进化。与 GPV VP1 蛋白氨基酸序列比对结果发现,13 株 NDPV(含 SDGT0628 株)有 Q89L、D142E、S450N 这 3 个氨基酸位点的共同变异;分离株 SDGT0628 在 497 位氨基酸位点产生突变(W→R),其他 NDPV 和 GPV 未产生此差异。本实验室新分离出 5 株 NDPV,与 SDGT0628 株 VP1 氨基酸序列突变位点进

资助项目:国家重点研发计划(2022YFD1800602)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800602).

\*Corresponding authors. E-mail: XU Shouzhen, xsz2738@126.com; YANG Chenghuai, ychenghuai@163.com

Received: 2024-09-27; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-13

行比较, 5株NDPV均存在89、142、450位点突变。【结论】从山东省某鸭场中分离得到了一株NDPV, 命名为SDGT0628株(GenBank登录号PQ316314)。VP1蛋白的氨基酸序列分析发现, NDPV存在3个氨基酸位点的突变, SDGT0628在497位氨基酸位点产生了新的突变。

关键词: 新型鸭细小病毒; 分离鉴定; 分子特征; 遗传进化

## Isolation, identification, and phylogenetic characterization of a strain of novel duck parvovirus

LI Dan<sup>1,2</sup>, YANG Xiaoyue<sup>2</sup>, SONG Yafen<sup>2</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Bing<sup>2</sup>, XU Shouzhen<sup>\*1</sup>, YANG Chenghui<sup>\*2</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract: [Background]** Since 2015, disease outbreaks have occurred in Cherry Valley ducks and other commercial meat ducks in the eastern coastal areas of China and have gradually spread inland. The diseased ducks present short beaks, enlarged tongues, stunted growth, and easy fractures of leg bones. The pathogenic agent of this disease was identified as novel duck parvovirus (NDPV). **[Objective]** To reveal the genetic evolution of NDPV by epidemiological investigation, so as to provide a basis for understanding the genetic evolution laws, enriching the epidemiological data, and deciphering the pathogenic mechanism of NDPV. **[Methods]** The liver of a diseased duckling was grinded and the supernatant was obtained by centrifugation of the homogenate. The SPF-grade duck embryo was used for virus isolation and the virus titer was measured. PCR was employed to identify the isolated virus and detect exogenous viruses. The whole genome of the isolated virus was amplified and analyzed for the sequence homology. Molecular characteristics and genetic evolution of the VP1 protein were analyzed. **[Results]** A NDPV strain, SDGT0628, was isolated from a duck farm with suspected short beak and dwarfism syndrome (SBDS) in Shandong Province. The strain was cultured with SPF-grade duck embryos, with the median lethal dose in duck embryos ( $DEL_{50}$ ) being  $10^{-4.5}/0.2$  mL. SDGT0628 showed the genome-wide nucleotide sequence homology of 99.8% with the strain TX2302 isolated in 2023 and 99.7% with strains SD0101 and LYG23. SDGT0628 showed the VP1 amino acid sequence homology of 99.9% with the strain SD0101 isolated in 2018. SDGT0628 had higher homology with goose parvovirus (GPV) than with muscovy duck parvovirus (MDPV). The phylogenetic tree built based on genome-wide nucleotide sequences showed that SDGT0628 formed a small independent branch with NDPV, demonstrating the continuous evolution of GPV. Compared with the amino acid sequence of GPV VP1 protein, those of 13 NDPV strains (including SDGT0628) had three common amino acid mutations, Q89L, D142E, and S450N. SDGT0628 produced a mutation W497R, which was not observed in other NDPV strains or GPV. Five strains of NDPV were newly isolated in our laboratory, and they were compared with SDGT0628 to reveal the amino acid mutations of the VP1 protein. The results showed that all the 5 strains of NDPV had mutations at positions 89, 142, and 450.

**[Conclusion]** In this study, a strain of NDPV was isolated from a duck farm in Shandong Province and named SDGT0628 (GenBank accession number PQ316314). NDPV had 3 mutations in the VP1 protein, and SDGT0628 had a new mutation of W497R.

**Keywords:** novel duck parvovirus; isolation and identification; molecular characteristics; genetic evolution

水禽细小病毒可在水禽中跨物种进行传播,属于细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒亚科(Parvovirinae)依赖病毒属(Dependovirus)的成员之一,主要包括鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)和番鸭细小病毒(muscovy duck parvovirus, MDPV)。GPV 可以引起雏鹅和雏番鸭的急性或亚急性败血性传染病,该病常被称为小鹅瘟。1956年,我国学者方定一在江苏省扬州市的发病雏鹅中首次发现该病,随后分离出世界上第一株 GPV<sup>[1-2]</sup>。该病在自然传染情况下多感染 1 月龄以下的雏鹅,10 日龄以内雏鹅的发病率和死亡率常高达 95%–100%;10–30 日龄以内雏鹅的死亡率通常为 30%–70%;发病日龄越小、死亡越多<sup>[3]</sup>。其主要临床症状为精神萎靡,采食减少,饮水增加,摇头,甩鼻,排黄色水样或混有泡沫的稀粪,头部上仰、呈角弓反张姿势;剖检可见小肠栓塞,直肠黏膜出血,肝脏肿大、质脆,脾脏充血,肾脏肿胀等,此病已成为危害鹅养殖业的重要疫病之一<sup>[4-5]</sup>。

近年来,商品肉鸭出现短喙、舌外伸肿大、生长发育不良、腿骨易折等临床症状,俗称“鸭大舌病”,也叫作短喙侏儒症(short beak and dwarfism syndrome, SBDS)<sup>[6-9]</sup>,根据 PCR 鉴定以及序列分析结果,确定其病原是 GPV 变异株,暂时被称为新型鸭细小病毒(novel duck parvovirus, NDPV)或新型鹅细小病毒(novel goose parvovirus, NGPV)<sup>[8,10]</sup>。最早于 1989 年,我国台湾省报道了 1 例由 NDPV 和鸭肝炎病毒混合感染的病例,但并未引起足够重视<sup>[11]</sup>。自 2015 年以来,我国山东、江苏、安徽和河北等北方沿海省份以及

河南地区陆续暴发了 SBDS,并逐步向内陆传播<sup>[8,12-13]</sup>。研究表明,NDPV 可以感染樱桃谷鸭、北京鸭、番鸭、半番鸭、台湾白鸭等,宿主较 GPV 广,发病日龄多为 6–40 日龄,发病率为 5%–20%,病死率低,发病鸭绝大多数成为僵鸭,给我国养鸭业造成了巨大经济损失<sup>[14]</sup>。

NDPV 为单链、线状 DNA 病毒,基因组中间包括 2 个大的开放阅读框(open reading frame, ORF)和两端的末端倒置重复序列(inverted terminal repeat, ITR)。左侧 ORF 编码非结构蛋白(non-structural protein, NS) NS1 和 NS2;右侧 ORF 编码 VP1、VP2 和 VP3 结构蛋白,三者为依次包含的重叠结构,有相同的羧基端,共用一个终止密码子<sup>[15]</sup>。研究发现 VP1 结构蛋白可能在病毒的致病性和对宿主的感染范围中起到重要作用<sup>[16-17]</sup>。因此,深入研究 VP1 蛋白基因对于疾病防控具有重要意义。

本研究旨在对 NDPV 进行分离鉴定并分析其遗传演化特征,为完善该病流行病学数据、深入理解其致病机制及制定更有效的防控策略提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

病料来自 2021 年 6 月山东某鸭场疑似发病雏鸭的肝脏,与适量灭菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 混合,充分研磨后制成组织匀浆,反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清置于 2.0 mL 的灭菌离心管中,置于–80 °C 冰箱保存。

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸭

蛋(品种为麻鸭), 山东昊泰实验动物繁育有限公司, 孵化至 9 日龄备用; SPF 鸡胚购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。该动物实验方案经过中国兽医药品监察所实验动物福利伦理委员会审核, 符合动物保护、动物福利和伦理原则, 并遵守实验动物福利伦理的相关规定[伦理审批编号: 中监所(福)2024 第 00321 号]。

## 1.2 主要试剂和仪器

MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 和 2×*Ex Taq*™ 预混酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 高保真酶 KOD FX Neo, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 通用型 DNA 纯化回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像仪和核酸电泳仪, Bio-Rad 公司; 台式高速冷冻离心机, Thermo Fisher 公司。

## 1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 GPV 基因序列的保守区域, 设计一对 GPV 检测引物 GPV-F (5'-CCAAC AGAGCAGCAAAGA-3') 和 GPV-R (5'-GTGGT CGCRGGTCCGTAGA-3'), 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。鸭圆环病毒(duck circovirus, DuCV)、鸭瘟病毒(duck enteritis virus, DEV)、鸭坦布苏病毒(duck tembusu virus, DTMUV)、禽腺病毒(fowl adenovirus, FAdV)、禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)、新型鸭呼肠孤病毒(novel duck reovirus, NDRV)、鸭肝炎病毒 I 型(duck hepatitis viral-I, DHV-I) 和鸭肝炎病毒 III 型(duck hepatitis viral-III, DHV-III) 的特异性引物由本实验室保存。

## 1.4 病毒的分离培养

取组织匀浆上清经 0.22 μm 滤器过滤, 分别经尿囊腔和卵黄囊各接种 10 枚 9 日龄 SPF 鸭胚和 6 日龄 SPF 鸡胚, 0.2 mL/枚; 对照组注

射等量的无菌生理盐水。接种后鸭胚和鸡胚均置于 37 °C 恒温培养箱培养 7 d, 每天观察接种后胚的存活情况, 弃去 24 h 内死亡胚。继续盲传至 3 代以上, 如有死亡, 则及时无菌收取尿囊液及胚体; 如未出现死亡, 则该病毒不致死鸡胚或鸭胚。

## 1.5 外源病毒检测

按照 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取试剂盒提取特异性死亡鸭胚尿囊液中的 DNA/RNA。根据 2×*Ex Taq*™ 预混酶使用说明, 分别用 GPV、DuCV、DEV、FAdV 特异性引物对 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×*Ex Taq* 12.5 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, 模板 4 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。根据 One Step RT-PCR Kit 使用说明, 分别用 DTMUV、AIV、NDV、NDRV、DHV-I、DHV-III 特异性引物对提取的基因组 RNA 进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系: PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μL, 2×1 Step Buffer (Dye Plus) 12.5 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL, 模板 2.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。RT-PCR 反应条件: 50 °C 30 min; 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

## 1.6 病毒含量的测定

取出现病变的第 8 代 SPF 鸭胚尿囊液, 使用灭菌生理盐水对其进行 10 倍系列稀释 (10<sup>-1</sup>–10<sup>-6</sup>), 每个稀释度经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸭胚(0.2 mL/胚)各 5 枚, 置 37 °C 恒温培养箱培养 7 d, 弃去 24 h 内死亡胚, 每天记录各稀释度病毒所致鸭胚死亡数, 按 Reed-Muench 法计算病毒的鸭胚半数致死量(DEL<sub>50</sub>)<sup>[18]</sup>。

## 1.7 病毒全基因组扩增

根据 GenBank 中已发表的多株 GPV 全基因组序列设计了 7 对相互重叠的引物(表 1)<sup>[19-20]</sup>, 引

表 1 NDPV 全基因组 PCR 扩增引物

Table 1 NDPV whole genome PCR amplification primer

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)
P1-F	TGTGGCAGCATCTGAAAT	1 621
P1-R	TTACAGATTTTGAGTTAGAT	
P2-F	GAAAAGACCCTGTCCTGG	1 111
P2-R	GCTTTCAGATTCCGCCAC	
P3-F	CGAACGAGCCAGAGGAGC	1 080
P3-R	ATTGGGAATCGCAATGCC	
P4-F	GCATGCCGCGCGGTGACCCCAATA	1 034
P4-R	ATTTCAATGAGCCAATCAACAAGG	
P5-F	CGCTCATTACAGGACTTAGACAGGCTTAT	1 209
P5-R	CTGTTAGGTTGACCACGCGCATGC	
P6-F	AAGAGAGTGATTTGGCTG	352
P6-R	CCTATGTATTGAGGGTTG	
P7-F	CTTATTGGAGGGTTCGTTTCGT	191
P7-R	GCATGCGCGTGGTCAACCTAACA	

物由北京六合华大基因科技有限公司合成。以发生特异性死亡的鸭胚尿囊液为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 12.5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 5 μL, KOD FX Neo (1 U/μL) 0.5 μL, 上、下游引物(20 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 48–64 °C 30 s, 68 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将阳性目的条带经通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收, 产物送北京六合华大基因科技有限公司测序。为了克服对具有发夹结构的 ITR 区域进行测序的困难, 利用 *Sph* I 酶切位点(GCATGC)为分界点, 将 ITR 区分成了 2 段进行扩增<sup>[20]</sup>。

### 1.8 分子特征和遗传进化分析

采用 SeqMan 软件拼接测序得到的结果。在 GenBank 中下载 10 株 GPV、12 株 NDPV、9 株 MDPV 毒株全基因组和 VP1 蛋白氨基酸序列, 用 MegAlign 将测序所得序列与下载好的参考序列进行同源性比较, 并使用 MEGA 11 软件绘制系统发育树。用于比对分析的 GPV、NDPV 和 MDPV 毒株信息见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 新型鸭细小病毒的增殖

将组织匀浆上清接种 SPF 鸭胚盲传, 第 3 代 SPF 鸭胚开始出现死亡, 继续传代至第 8 代, SPF 鸭胚死亡时间均为 72–144 h, 死亡 SPF 鸭胚绒毛尿囊膜增厚、尿囊液浑浊、胚体出血、发育迟缓, 对照组 SPF 鸭胚生长发育良好(图 1)。收集胚体及尿囊液, 置于–80 °C 冰箱保存、备用。SPF 鸡胚盲传至第 5 代未出现特异性死亡, 胚体无明显病变, PCR 鉴定为阴性, 证明 NDPV 在 SPF 鸡胚上不能增殖。

### 2.2 新型鸭细小病毒的鉴定结果

从特异性死亡鸭胚尿囊液中提取病毒基因组进行 PCR/RT-PCR 检测, 仅有 GPV 检测引物扩增出阳性条带, DuCV、DEV、FAvV、DTMUV、AIV、NDV、NDRV、DHV-I 和 DHV-III 特异性引物扩增结果均为阴性, 证明分离毒株无外源病毒的污染。

### 2.3 新型鸭细小病毒含量的测定结果

病毒传代过程中发现分离毒株可以在 SPF 鸭胚上稳定增殖, 因此, 在 SPF 鸭胚上测定了分离毒株 P8 代次鸭胚尿囊液的病毒含量, 其 *DELD*<sub>50</sub> 为 10<sup>-4.5</sup>/0.2 mL。

表 2 参考毒株序列信息

Table 2 Refer to the strain sequence information

病毒 Virus	毒株 Strain	宿主 Host	来源 Source	分离年份 Separation year	GenBank 登录号 GenBank accession No.	
NDPV	CVSD01	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国山东 Shandong, China	2015	KU641558	
	FJ/15	半番鸭 Mule duck	中国福建 Fujian, China	2015	KU844283	
	GD	半番鸭 Mule duck	中国广东 Guangdong, China	2016	MH444514	
	AH	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国安徽 Anhui, China	2016	MH444513	
	SC16	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国山西 Shanxi, China	2016	KY679174	
	AH1605	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国安徽 Anhui, China	2016	MF441227	
	JS1603	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国江西 Jiangxi, China	2016	MF441226	
	SD0101	绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	中国山东 Shandong, China	2018	MT084128	
	AH0316	绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	中国安徽 Anhui, China	2019	MT084125	
	SD0316	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国山东 Shandong, China	2019	MN415969	
	TX2302	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国 China	2023	PQ241040	
	LYG23	樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	中国 China	2023	PQ241039	
	GPV	B	鹅 Goose	匈牙利 Hungary	1960	U25749
		SYG61v	鹅 Goose	中国扬州 Yangzhou, China	1961	KC996729
		GDaGPV	鹅 Goose	中国广东 Guangdong, China	1978	HQ891825
		98E	鹅 Goose	中国黑龙江 Heilongjiang, China	1998	KT598506
YZ99-6		鹅 Goose	中国扬州 Yangzhou, China	1999	KC996730	
06-0329		鹅 Goose	中国台湾 Taiwan, China	2006	EU583391	
VG32/1		鹅 Goose	中国台湾 Taiwan, China	2008	EU583392	
RC16		鹅 Goose	中国 China	2020	ON637108	
HB-DX		鹅 Goose	中国 China	2020	OR544341	
NP5		鹅 Goose	中国 China	2021	PQ272760	
MDPV	P	番鸭 Muscovy duckling	中国福建 Fujian, China	1988	KU844281	
	FZ91-30	番鸭 Muscovy duckling	中国扬州 Yangzhou, China	1991	KT865605	
	YY	番鸭 Muscovy duckling	中国扬州 Yangzhou, China	2000	KX000918	
	JH10	番鸭 Muscovy duckling	中国浙江 Zhejiang, China	2010	MH807698	
	GX5	番鸭 Muscovy duckling	中国广西 Guangxi, China	2011	KM093740	
	SASS-SHNH	番鸭 Muscovy duckling	中国上海 Shanghai, China	2012	KC171936	
	GD201911	番鸭 Muscovy duckling	中国广东 Guangdong, China	2019	MT450871	
	XXM	番鸭 Muscovy duckling	中国 China	2021	MZ334491	
	GD-23/2023	番鸭 Muscovy duckling	中国 China	2023	PP763298	



图1 NDPV感染SPF鸭胚后病变图 A: NDPV感染SPF鸭胚(120 h); B: 正常SPF鸭胚。

Figure 1 Image of NDPV infected SPF duck embryo. A: NDPV infected SPF duck embryo (120 h); B: Normal SPF duck embryo.

## 2.4 全基因组扩增结果

通过PCR方法进行分段扩增,获得了7段目的片段,测序后拼接,得到该病毒的全基因组序列。全基因组序列全长为5 058 bp,左右两侧ITR长度均为382 bp,NS基因长度为1 884 bp,编码627个氨基酸;VP1基因长度为2 199 bp,编码732个氨基酸。通过全基因组序列分析比较,确定分离到的病毒为NDPV,命名为SDGT0628 (GenBank登录号PQ316314)。

## 2.5 病毒的分子特征和遗传进化分析

将测序所得的核苷酸序列与数据库(GenBank)中下载的31株参考毒株的基因序列进行同源性比较,结果显示,SDGT0628与GenBank下载的12株NDPV核苷酸相似性在96.8%–99.8%之间,与2023年分离株TX2302的核苷酸相似性最高为99.8%,与2018年分离株SD0101和2023年分离株LYG23的核苷酸相似性次之,为99.7%;SDGT0628与GPV核苷酸相似性在92.5%–96.1%之间;与MDPV的核苷酸相似性为81.0%–85.0%。全基因组遗传进化结果显示SDGT0628株与12株NDPV位于同一进化分支上,与GPV构成了一个大的分支;MDPV单独在另一分支,与SDGT0628株亲缘关系相对较远(图2)。

## 2.6 VP1蛋白的分子特征和遗传进化分析

SDGT0628株与31株参考毒株的VP1氨基

酸序列同源性比对表明,SDGT0628株与经典GPV的氨基酸相似性为95.5%–98.1%;与MDPV的氨基酸相似性为87.8%–91.5%;与NDPV的相似性达到97.8%–99.9%,相似性最高的为2018年分离株SD0101株,与全基因组序列分析结果一致(图3)。

VP1蛋白氨基酸序列比对发现,与GPV经典毒株相比,包括SDGT0628株共13株NDPV有3个相同的氨基酸位点变异:89(Q→L)、142(D→E)、450(S→N)。SDGT0628同GPV和NDPV相比有一个氨基酸位点497(W→R)的变化。

从山东、河北、河南等地的樱桃谷鸭源中新分离出5株NDPV,对VP1蛋白基因序列进行测序并上传至NCBI数据库,分别命名为SDLY0124 (GenBank登录号PQ593523)、HBXT0314 (GenBank登录号PQ593524)、HNXX0529 (GenBank登录号PQ593526)、SDJN0110 (GenBank登录号PQ593527)、SDJN0576 (GenBank登录号PQ593528)。新分离的5株NDPV与SDGT0628分离株VP1氨基酸序列变异位点进行比较,结果显示,5株NDPV VP1氨基酸序列均存在89(Q→L)、142(D→E)、450(S→N)位点突变,同SDGT0628株一致,但497(W→R)均未出现突变。89、142、450氨基酸位点突变在下载12株NDPV以及实验室分离的6株NDPV中共同存在,值得引起关注。但这

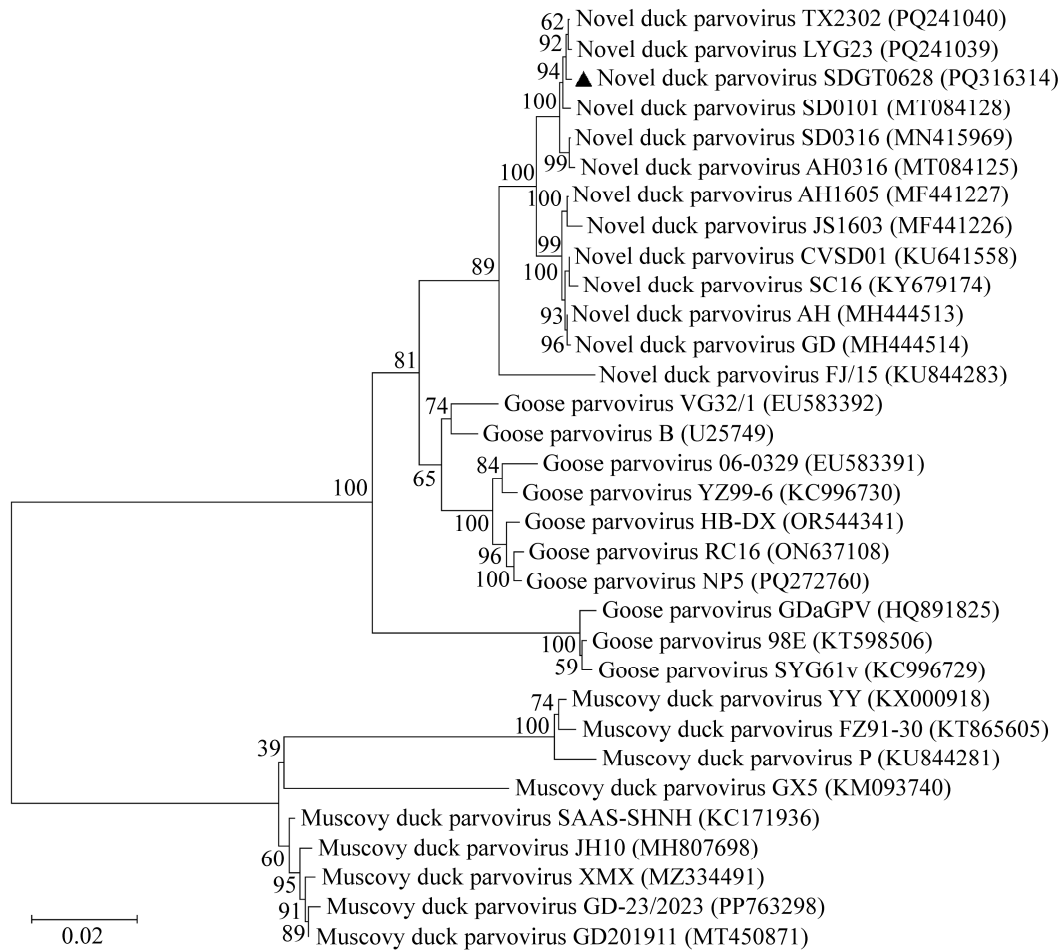


图2 分离株 SDGT0628 全基因组的系统进化分析 分支点上数字表示重复 1 000 次后得到的自展值；括号内序号为 GenBank 序列登录号；标尺代表进化距离单位。

Figure 2 Phylogenetic analysis of the whole genome of isolate SDGT0628. The number on the branch indicates bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The sequence number in parentheses are GenBank accession number; Scale indicates evolution distance.

3 个变异位点是否与病毒传染性、宿主范围和致病性之间存在关联，需要进一步实验来证实。

### 3 讨论

2015 年起，中国沿海城市的鸭群中陆续暴发了短喙侏儒综合征，并逐步向内陆鸭群蔓延，给各地的养鸭业带来了不同程度的影响。本研究从山东高唐某鸭场的病鸭肝脏组织中成功分离得到一株 NDPV，命名 SDGT0628 株。SDGT0628 株能在鸭胚中稳定增殖，传至第 3 代鸭胚开始出现死亡，死亡胚体全身出血，传代至第 8 代，测

得其  $DEL_{D50}$  为  $10^{-4.5}/0.2$  mL，与研究人员分离到的 NDPV 在鸭胚中的培养结果一致<sup>[8,21]</sup>。然而，通过卵黄囊接种，在鸡胚上连续传代至第 5 代，均未出现特异性病变，PCR 检测为阴性，所以 NDPV 不宜用鸡胚进行分离。

全基因组测序结果发现，分离株 SDGT0628 基因组序列全长为 5 058 bp，左右两侧 ITR 长度均为 382 bp，NS 基因长度为 1 884 bp，编码 627 个氨基酸；VP1 基因长度为 2 199 bp，编码 732 个氨基酸。分离株 SDGT0628 与 31 株参考序列进行核苷酸序列的同源性比较，结果显示，



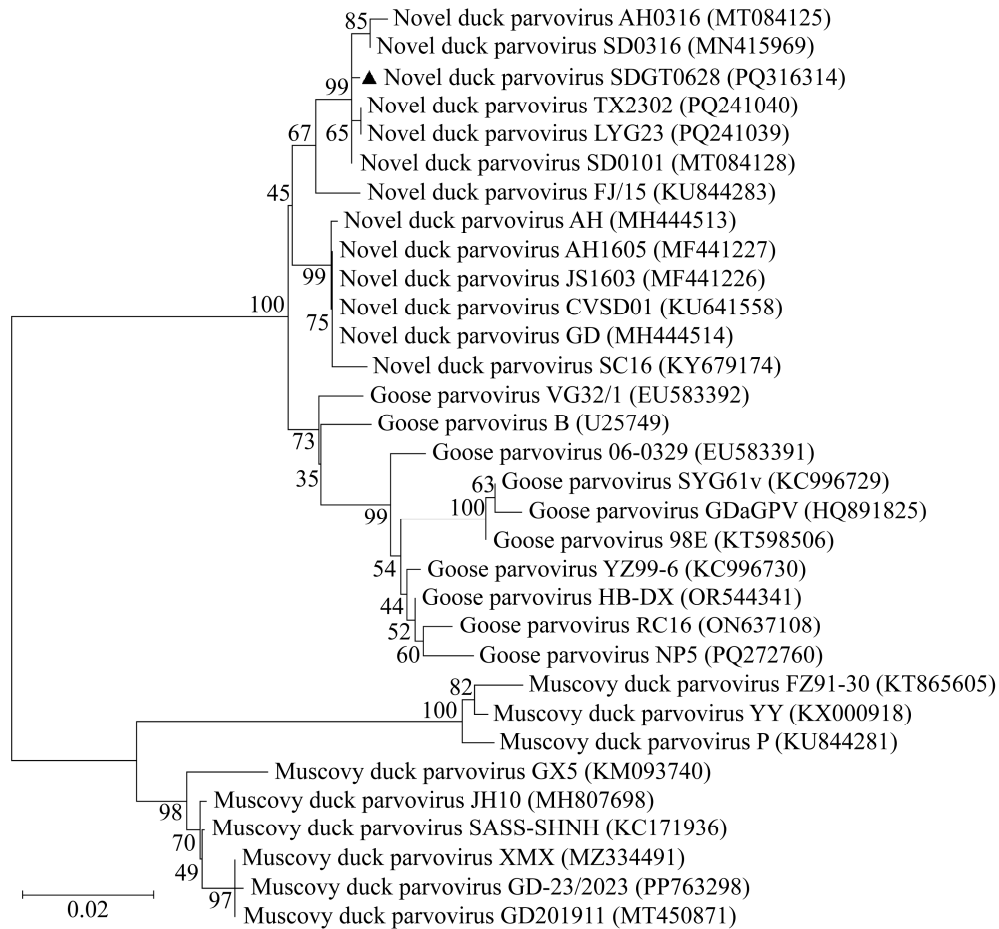


图3 分离株 SDGT0628 VP1 蛋白的系统进化分析 分支上数字表示重复 1 000 次后得到的自展值；括号内序号为 GenBank 序列登录号；标尺代表进化距离单位。

Figure 3 Phylogenetic analysis of VP1 protein in isolates SDGT0628. The number on the branch indicates bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The sequence number in parentheses are GenBank accession number; Scale indicates evolution distance.

SDGT0628 株与 GenBank 下载的 12 株 NDPV 核苷酸相似性最高，均在 96.8%及以上，与 2023 年分离株 TX2302 株的核苷酸相似性最高为 99.8%，与 2018 年分离株 SD0101 株和 2023 年分离株 LYG23 株的核苷酸相似性次之，均为 99.7%，根据结果推断，本实验分离株为近年来流行毒株；与 GPV 核苷酸相似性在 92.5%–96.1%之间；与 MDPV 核苷酸相似性只有 81.0%–85.0%。VP1 氨基酸同源性比对分析，SDGT0628 株与 NDPV 的相似性高达 97.8%以上；与 GPV 氨基酸相似性次之；与 MDPV 氨基酸相似性较低，与全基

因组序列分析结果一致，SDGT0628 株与山东 SD0101 株相似性最高，为 99.9%，推断近年来山东地区 NDPV 流行毒株可能由同一毒株变异而来。分析 VP1 蛋白的差异，发现 13 株 NDPV (含分离株 SDGT0628)氨基酸位点同 GPV 经典毒株相比有 3 个共同变异，89 (Q→L)、142 (D→E)、450 (S→N)；分离株 SDGT0628 有一个特有的变异位点 497 (W→R)。乔丹丹等<sup>[22]</sup>学者最新发现，从山东、广西地区分离到的 2 株 NDPV 均在 VP3 蛋白氨基酸中出现 290 (T→A)位变异位点，是近年来新发现的变异位点。郑文丽等<sup>[23]</sup>从山东地

区分得到 8 株 NDPV, 对 VP3 基因构建系统进化树发现, 8 株 NDPV 与其他细小病毒均在同一大的分支上, 但处于不同的亚支, 提示 NDPV 或已发生变异。通过各学者试验数据及本试验结果发现, NDPV 还在不断地变异当中, 并且变异速度令人咋舌。本实验室从山东、河北、河南等地的樱桃谷鸭源中新分离出 5 株 NDPV, 与 SDGT0628 株 VP1 氨基酸突变位点进行比较, 5 株氨基酸序列均存在 89 (Q→L)、142 (D→E)、450 (S→N) 位点突变, 497 (W→R) 位氨基酸是 SDGT0628 株特有的突变位点。焦凤超等<sup>[24]</sup>研究发现, NDPV 有 8 个较为经典的 VP1 氨基酸变异位点, 89 (Q→L)、114 (D→H/D)、116 (Q/R→H/Q)、142 (D→D/E)、180 (A→A/V)、450 (S→N/S)、498 (S→S/N)、660 (H→H/N), 与本实验发现的 89、142、450 位氨基酸的变异相符合, 但这 3 个变异位点是否会影响病毒传染性和宿主范围, 需要进一步的实验来证实。

本研究共获得 6 株 NDPV, 对 VP1 结构蛋白基因进行测序, 发现与经典 GPV 毒株之间氨基酸位点的差异, 这可能会导致宿主范围的转移。有学者研究发现, GPV、NDPV 及 MDPV 三者之间可以发生相互重组事件, 使重组病毒的宿主范围更广, 大大增加了临床防控的困难<sup>[25]</sup>。最新研究发现, GPV 产生变异, 可感染鸵鸟, 增加了其感染的宿主谱<sup>[26]</sup>。然而, 临床实践中仍缺乏有效的预防 NDPV 感染的措施, 传统的治疗方法主要围绕抗生素治疗为主<sup>[27]</sup>。本实验室正在进行该病毒的传代致弱以及对亚单位疫苗的研究, 以期鸭短喙侏儒症的预防提供一种新的解决方案。同时, NDPV 还在快速的变异当中, 因此, 开发安全、有效、灵活的疫苗策略, 成为当前亟待解决的紧迫任务。本研究对 SDGT0628 变异株结构蛋白基因组进行测序以及分子特征和遗传进化分析, 有助于更好地了解细小病毒的遗传演化特征, 为 NDPV 的研究提

供了数据支撑, 同时为 NDPV 的防控以及疫苗研制提供科学依据。

## 4 结论

本研究从山东某鸭场的患病鸭肝脏组织中成功分离得到一流行毒株 NDPV, 命名为 SDGT0628 株, 序列已上传至 NCBI (GenBank 登录号 PQ316314)。与 GPV VP1 蛋白氨基酸序列比对发现, NDPV 有 89 (Q→L)、142 (D→E)、450 (S→N) 这 3 个氨基酸位点的共同变异, 本实验分离株同 GPV、NDPV 相比有一个氨基酸位点 497 (W→R) 的突变。本研究为探究水禽细小病毒宿主的改变奠定了基础, 为完善 NDPV 流行病学数据和致病机制的研究提供了科学依据。

## REFERENCES

- [1] 方定一, 王永坤, 郑玉美, 周阳生, 江美娟, 董国雄. 小鹅瘟病原体及其特异防治的研究[J]. 中国农业科学, 1981, 14(4): 1-8, 97.  
FANG DY, WANG YK, ZHENG YM, ZHOU YS, JIANG MJ, DONG GX. Studies on the aetiology and specific control of gosling plague[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1981, 14(4): 1-8, 97 (in Chinese).
- [2] 方定一. “小鹅瘟”的介绍[J]. 中国兽医杂志, 1962(8): 19-20.  
FANG DY. Introduction of gosling plague[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1962(8): 19-20 (in Chinese).
- [3] 汤道玲, 袁海星, 徐强. 浅谈小鹅瘟[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2004, 34(2): 37-38.  
TANG DL, YUAN HX, XU Q. On the gosling plague[J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2004, 34(2): 37-38 (in Chinese).
- [4] 蔡俊呈, 陈礼斌, 林秋燕, 任涛. 水禽细小病毒病研究进展[J]. 养禽与禽病防治, 2023(10): 20-24.  
CAI JC, CHEN LB, LIN QY, REN T. Research progress of waterfowl parvovirus disease[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2023(10): 20-24 (in Chinese).
- [5] 汪开毓. 人工感染小鹅瘟的病理形态学研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(4): 377-384.  
WANG KY. Pathomorphological study on experimental gosling plague[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1998, 29(4): 377-384 (in Chinese).
- [6] 刘博, 祖立闯, 魏中锋, 谷英华, 毕研丽, 王文秀. 鸭源新型鹅细小病毒的分离鉴定与 VP1 基因序列分析[J]. 中国家禽, 2022, 44(12): 34-39.  
LIU B, ZU LC, WEI ZF, GU YH, BI YL, WANG WX. Isolation and identification of a novel goose parvovirus from duck and sequence analysis on VP1 gene[J]. *China Poultry*, 2022, 44(12): 34-39 (in Chinese).
- [7] ZHANG JY, LIU P, WU YY, WANG MS, JIA RY, ZHU DK, LIU MF, YANG Q, WU Y, ZHAO XX, ZHANG SQ, LIU YY, ZHANG L, YU YL, YOU Y, CHEN S, CHENG AC. Growth characteristics of the

- novel goose parvovirus SD15 strain *in vitro*[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 63.
- [8] 陈浩, 窦砚国, 唐熠, 颜敏, 王爱华, 郑肖强, 杨晶, 牛晓宇, 张大丙. 樱桃谷肉鸭短喙长舌综合征病原的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(10): 1600-1604. CHEN H, DOU YG, TANG Y, YAN M, WANG AH, ZHENG XQ, YANG J, NIU XY, ZHANG DB. Isolation and identification of the pathogen of beak atrophy and dwarfism syndrome in cherry valley duck[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(10): 1600-1604 (in Chinese).
- [9] 邹昕熠, 杜彦妮, 陈妹汐, 周文笛, 王文秀, 张馨月, 刘文涛, 蔡春雨, 罗启慧. 新型鸭细小病毒样颗粒的制备及鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5404-5412. ZOU XY, DU YN, CHEN SX, ZHOU WD, WANG WX, ZHANG XY, LIU WT, CAI CY, LUO QH. Preparation and identification of novel duck parvovirus virus-like particles[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5404-5412 (in Chinese).
- [10] 魏玲, 熊荣园, 王思怡, 梁洪, 龙冬梅, 杨国淋. 鸭源新型鹅细小病毒的分离鉴定及 VP2 蛋白的原核表达[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(12): 59-63. WEI L, XIONG RY, WANG SY, LIANG H, LONG DM, YANG GL. Isolation and identification of a duck-derived Novel goose parvovirus and prokaryotic expression of VP2 protein[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2024(12): 59-63 (in Chinese).
- [11] LU YS, LIN DF, LEE YL, LIAO YK, TSAI HJ. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in ducklings in Taiwan[J]. Avian Diseases, 1993, 37(2): 591-596.
- [12] CHEN H, DOU YG, TANG Y, ZHENG XQ, NIU XY, YANG J, YU XL, DIAO YX. Experimental reproduction of beak atrophy and dwarfism syndrome by infection in cherry valley ducklings with a novel goose parvovirus-related parvovirus[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 183: 16-20.
- [13] GE ZQ, CHEN S, WANG MS, CHENG AC. Complete genome sequence of a novel goose parvovirus isolated in Sichuan Province, China, in 2016[J]. Genome Announcements, 2017, 5(23): e00428-17.
- [14] 王辉, 王秀云, 焦绪娜, 尹延敏, 逢宾宾. 新型鹅细小病毒研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(2): 115-118. WANG H, WANG XY, JIAO XN, YIN YM, PANG BB. Progress in the study of novel goose parvovirus[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2020, 28(2): 115-118 (in Chinese).
- [15] 杜翔宇, 李温明, 胡振林, 张甜甜, 胡桂学, 董浩. 我国鹅细小病毒研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(6): 63-65. DU XY, LI WM, HU ZL, ZHANG TT, HU GX, DONG H. Research progress of goose parvovirus in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(6): 63-65 (in Chinese).
- [16] SHIEN JH, WANG YS, CHEN CH, SHIEH HK, HU CC, CHANG PC. Identification of sequence changes in live attenuated goose parvovirus vaccine strains developed in Asia and Europe[J]. Avian Pathology, 2008, 37(5): 499-505.
- [17] GOVINDASAMY L, HUEFFER K, PARRISH CR, AGBANDJE-MCKENNA M. Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants[J]. Journal of Virology, 2003, 77(22): 12211-12221.
- [18] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 附录 27. China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: Appendix 27.
- [19] BIAN GZ, MA HB, LUO MP, GONG FP, LI B, WANG GP, MOHIUDDIN M, LIAO M, YUAN JF. Identification and genomic analysis of two novel duck-origin GPV-related parvovirus in China[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 88.
- [20] 崔元. 鸭细小病毒 SD 株分离与鉴定及基因组特征分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2018. CUI Y. Isolation and identification of duck parvovirus SD strain and analysis of genomic characteristics[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [21] 张锦玥. 新型鹅细小病毒 SD15 株的分离鉴定及其增殖特性的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2019. ZHANG JY. Isolation, identification and replication characteristic of novel goose parvovirus SD15 strain[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [22] 乔丹丹, 刘婷隽, 陈全刚, 李德宝, 周婕, 董淑红, 胡安康. 山东、广西地区新型鹅细小病毒全基因组扩增及遗传进化分析[J]. 中国家禽, 2024, 46(6): 44-55. QIAO DD, LIU TJ, CHEN QG, LI DB, ZHOU J, DONG SH, HU AK. Whole genome amplification and genetic evolution analysis of novel goose parvovirus isolated from Shandong and Guangxi[J]. China Poultry, 2024, 46(6): 44-55 (in Chinese).
- [23] 郑文丽, 黄振兴, 高菲, 韦天超. 我国山东部分地区 2019-2022 年新型鸭细小病毒的流行病学调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2024(4): 28-34. ZHENG WL, HUANG ZX, GAO F, WEI TC. Epidemiological investigation of new duck parvovirus in Shandong province in 2019-2022[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2024(4): 28-34 (in Chinese).
- [24] 焦凤超, 张鑫, 李迎晓, 雷震, 曲哲会, 董建国, 赵瑜, 何书海, 李洵, 黄立, 赵聘. 新型鹅细小病毒信阳株的全基因组扩增及遗传进化分析[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(1): 112-119. JIAO FC, ZHANG X, LI YX, LEI Z, QU ZH, DONG JG, ZHAO Y, HE SH, LI X, HUANG L, ZHAO P. Whole genome amplification and phylogenetic analysis of novel goose parvovirus Xinyang strain[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(1): 112-119 (in Chinese).
- [25] WANG S, CHENG XX, CHEN SL, XIAO SF, CHEN SY, LIN FQ, WU NY, YU FS, ZHU XL, WANG JX, CHENG YQ. Identification of a novel goose parvovirus (GPV) recombinant associated with short beak and dwarfism syndrome in Mainland China, 2015[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016, 41: 289-291.
- [26] ZHAO K, HAO XP, LEI BS, DONG SS, WANG JF, ZHANG WC, WANG JC, YUAN WZ. Emergence and genomic analysis of a novel ostrich-origin GPV-related parvovirus in China[J]. Poultry Science, 2022, 101(7): 101929.
- [27] 张洪艳. 鸭新型鹅细小病毒病的诊断及防控措施[J]. 家禽科学, 2024, 46(9): 99-102. ZHANG HY. Diagnosis and prevention and control measures of new goose parvovirus disease in ducks[J]. Poultry Science, 2024, 46(9): 99-102 (in Chinese).