

## 近期泰安周边地区鸭病毒性肝炎流行情况调查

程子龙<sup>1</sup>,吴海波<sup>2</sup>,于涛<sup>3</sup>,岳瑞超<sup>1</sup>,刘思当<sup>1\*</sup>

1. 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018
2. 山东大宝养殖加工有限责任公司, 山东 泰安 271000
3. 新泰市新甫街道兽医站, 山东 泰安 271200

**摘要:** 为探究泰安周边地区接种鸭病毒性肝炎疫苗或打了卵黄抗体的鸭群仍然发生病毒性肝炎的真正原因,我们对2014年4~8月份送检的10份疑似鸭病毒性肝炎病例进行了剖检诊断、组织病理学观察及RT-PCR检测,并进行遗传进化及同源性分析。结果显示,10份病例在临床症状及病理学变化上均符合鸭病毒性肝炎的特征,但只有7份病例PCR诊断为DHV阳性,3份为阴性。这7份病毒的VPO基因同源性在98.6%~100%,与DHV-A、DHV-B处于不同分支,同源性均不足76%,与中国分离株JS2010、C-YCW处于较小的分支上,同源性在98.3%~98.9%,亲缘关系最近,但为不同小分支,表明我们检测到的鸭病毒性肝炎毒株为DHV-C型,但与中国分离株JS2010、C-YCW存在一定差异性。以上结果表明,DHV-C已成为鲁中地区当前流行的优势毒株,注射针对DHV-A的疫苗或卵黄抗体无效现象的发生可能与此有关。

**关键词:** 鸭病毒性肝炎; 流行; 新型

**中图分类号:** S858.32

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)05-0674-04

## The Recent Investigation for the Prevalence of Duck Virus Hepatitis in Peripheral Regions of Tai'an City

CHENG Zi-long<sup>1</sup>, WU Hai-bo<sup>2</sup>, YU Tao<sup>3</sup>, YUE Rui-chao<sup>1</sup>, LIU Si-dang<sup>1\*</sup>

1. College of Animal Science and Technology/Shandong Agriculture University, Tai'an 271000, China
2. Shandong Dabao Breeding and Processing Co. Ltd, Tai'an 271200, China
3. Veterinary Station of Xinpu Street in Xin'tai City, Xin'tai 271200, China

**Abstract:** In the present study we investigated the prevalence and molecular characterization of Duck hepatitis virus in and around Tai'an area. From the suspected duck population we collected about 10 samples during the period of April to August 2014. Initially these samples were evaluated by necropsy, histopathological observation and RT-PCR findings. For further confirmatory studies these samples were subjected to genetic evaluation and homology analysis. The clinical symptoms and histopathological changes revealed that all the samples showed the presence of duck virus hepatitis. Out of the total samples seven were conformed for the presence of viral RNA by RT-PCR. The genetic evaluation and homology analysis of the positive sample on VP0 gene was 98.6%~100%, showed close similarities with previously reported Chinese isolates JS2010 and C-YCW homologies, 98.3%~98.9%. Although these isolates having close phylogenetic relationship but still having some variation in the small branches, which suggested that the present isolates having certain difference from the previous isolates. It is clear that DHV isolate from all the positive samples having less than 76% similarity with DHV-A and DHV-B. Taken together, results suggest that DHV isolated from Shandong province of china is different from the early isolated DHV-A and DHV-B type and is concenter as a new DHV type (DHV-C). Thus for the better control of this economically important disease in Shandong province, it is necessary to use the newly isolated strain for Vaccine preparation.

**Keywords:** DVH; prevalence; new type

鸭病毒性肝炎(DVH)是由鸭病毒性肝炎病毒(DHV)引起的以雏鸭肝脏出血为特征的高致死率接触性传染病。现在普遍认为有三种不同的病毒与该病有关,分别是1型、2型和3型<sup>[1]</sup>。Kim报道了他们分离的5株DHV-1的全基因组序列,建议将其划分为小RNA病毒科的一个新成员<sup>[2]</sup>。2005年,在“国际病毒分类委员会的第八次报告”中,已将2型DHV归入星状病毒科星状病毒属,命名为1型鸭星状病毒<sup>[3]</sup>。Todd等通过对RT-PCR产物进行序列分析和同源性比较后发现,3型DHV也是一种星状病毒<sup>[4]</sup>;但它有别于1型鸭星状病毒,与2型火鸡星状病毒关系更为密切。1型和3型DHV之间没有任何抗原相关性<sup>[5]</sup>。

其中,1型鸭病毒性肝炎呈世界性分布,流行于美国、英国、韩国、加拿大等国家<sup>[5,6]</sup>;而2、3

**收稿日期:** 2015-03-19

**修回日期:** 2015-04-08

**基金项目:** 山东省农业科技成果转化资金项目:肉鸭重大疫病综合监控技术集成与示范(20123082)

**作者简介:** 程子龙(1991-),男,山东聊城人,在读硕士,研究方向为动物临床病理学. E-mail:chengzilong2014@126.com

**\*通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:liusid@sdau.edu.cn

型鸭病毒性肝炎病毒感染则具有明显的地域性, 2 型感染仅见于英格兰的东英地区, 且自 20 世纪 80 年代中期暴发后, 该地区也再未发生过<sup>[5,7]</sup>。至今, 3 型鸭病毒性肝炎主要在美国发生<sup>[5,8,9]</sup>。近年来, 国内各地不断出现免疫了 DHV-1 疫苗或者打了鸭病毒性肝炎卵黄抗体之后仍然发病的报道, 人们怀疑可能是 DHV-1 变异株和新的血清型 DHV 感染所致。这些新型 DHV 目前被分为台湾新型和韩国新型 DHV<sup>[12]</sup>。不同血清型的 DHV 的基因分析结果表明, DHV-1 和新型(台湾新型和韩国新型)DHV 位于小 RNA 病毒科中不同分支上。Wang 等建议将血清 1 型、台湾新型和韩国新型分为 DHV A、B 和 C 三种基因型。

近年来, 随着山东畜牧业的迅速发展, 鸭的养殖量越来越多, 而鸭病也变得异常复杂。在山东地区, 许多鸭场在用了鸭病毒性肝炎疫苗或卵黄抗体以后依旧发病, 而且伤亡严重, 给养殖场/户造成了严重的经济损失。为了进一步了解近期鸭病毒性肝炎的流行情况、发病特点、发病原因及病原特征, 制定相应的防治措施, 我们对 2014 年 4~8 月份以来送诊的疑似鸭病毒性肝炎临床病例进行了流行病学、病理学、病毒学等系列化调查研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鸭病毒性肝炎临床疑似病例主要来自山东泰安及其周边地区的发病肉鸭养殖场; 病理组织学切片及染色在山东农业大学动科院生物切片室进行; DL5000 DNA Marker、无 RNase 双蒸水, EasyPure™ Viral DNA/RNA Kit 购自北京全式金生物科技有限公司; EasyScript™ One-Step RT-PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 病料采集 对送诊的疑似鸭病毒性肝炎病例进行病理学剖检, 对符合鸭病毒性肝炎病变的疑似病例, 详细记录病死鸭信息, 并进行编号。取脑、肝、脾、心脏等器官组织, 分成两份, 一份用 10% 的福尔马林溶液固定; 另一份贮存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 组织病理学观察 将在 10% 福尔马林溶液中固定好的组织经修块、水冲、酒精梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片流程制作常规石蜡切片, 然后进行 HE 染色, 光学显微镜下观察组织学病变。

1.2.3 RNA 提取及 PCR 鉴定 取 -80 °C 冰箱中保存的疑似鸭病毒性肝炎的病鸭组织, 将各组织用匀浆机进行混合研磨, 4000 rpm 离心 5 min, 弃掉沉淀, 取上层液体作为提取的样本, 并做相应的编号。按照 EasyPure™ Viral DNA/RNA Kit 说明书的步骤进行 RNA 提取。参考张臣伟根据 1 型鸭病毒性肝炎 VP0 基因设计的引物: F:GCTCCAGACTAGTTCCTGAGG; R:CGGAGATCCAAGATGGCATA 进行 RT-PCR 检测, 目的片段 684 bp。20 μL 体系组成如下: EasyScript One-Step Enzyme Mix 0.3 μL, 2×One-Step Reaction Mix 10 μL, RNase-free Water 4.7 μL, 上游引物 F(10 μM)1 μL, 下游引物 R(10 μM)1 μL, 模板 3 μL, RT-PCR 反应条件如下: 42 °C 反转录 25 min, 95 °C 预变性 5 min, 然后进入 30 个循环 (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s), 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.4 序列测定及分析 将鸭病毒性肝炎的阳性 PCR 产物送去华大基因进行测序, 测序结果在 DNASTAR 上与 1 型参考株 (A、B、C 型) 进行比对, 绘制遗传进化树及遗传距离图。

## 2 结果

### 2.1 疑似病例症状表现及剖检病变

病鸭精神沉郁, 采食量减少, 运动失调, 死时呈角弓反张姿势。病死鸭主要表现肝肿大, 颜色变浅, 表面有斑点状出血。胆囊肿大, 充满墨绿色胆汁。肾肿大, 充血呈鲜红色, 切面隆起, 边缘外翻。有些病例胰腺有局灶性坏死。有的病例还见心内外膜条纹状出血病变。

### 2.2 组织病理学病变

肝细胞普遍肿胀, 呈空泡变性及脂肪变性病变, 常见严重的出血性坏死, 坏死肝细胞核碎裂、崩解, 肝细胞溶解成均质红染的颗粒状物质, 其中散在多少不等的红细胞、淋巴细胞和异嗜性粒细胞。个别病例可见胆管上皮细胞、卵圆细胞、间质结缔组织增生。脾脏、胰腺实质细胞表现不同程度的变性、坏死。肾小管上皮细胞普遍发生颗粒变性、水泡变性, 并见不同程度的坏死, 有的见许多异嗜性粒细胞浸润。大部分病鸭可见轻度的病毒性脑炎病变, 只有个别病例出现典型的袖套现象、小胶质细胞结节状增生。

### 2.3 PCR 鉴定结果

2.3.1 检测结果 对临床上具有明显的神经症状、剖检肝脏出血的病例进行了 PCR 检测。结果见表 1, 10 份病例中有 7 份为阳性, 3 份为阴性。

表 1 DHV-1 型鸭病毒性肝炎检测结果

Table 1 The test results of DHV-1

编号 No.	地区 District	发病日龄 Daily incidence	肝脏出血 Liver bleeding	神经症状 Neurological symptom	DHV-1 阳性 Positive DHV-1
1	泰安省庄	22	√	√	√
2	菏泽郓城	13	√	√	×
3	济宁兖州	30	√	√	√
4	济宁兖州	17	√	√	√
5	莱芜川水	20	√	√	√
6	泰安郊区	20	√	√	×
7	潍坊临朐	6	√	√	√
8	潍坊临朐	27	√	√	√
9	淄博桓台	17	√	√	×
10	泰安房村	10	√	√	√

注:“√”代表阳性;“×”代表阴性。Note:√ indicates the positive; × indicates the negative.

2.3.2 PCR 产物电泳结果 10 份 PCR 产物经过 1%的琼脂糖凝胶电泳, 结果发现有 7 份 PCR 产物在 684 bp 处有一条很亮的条带, 与预期的目的片段大小一致, 为阳性; 有 3 份 PCR 产物呈阴性(图 1)。

### 2.4 VP0 基因的遗传进化分析

将 7 株 DHV-1 阳性 PCR 产物测序, 与 DHV-1 经典代表株 C80、A66, B 型参考株 04G、90D, C 型参考株 AP-03337、AP-04009、AP-04114、C-YCW、C-YCZ、C-YDF 以及 1 型变异株 1v 等参考株进行序列比对, 发现我们所获得的 7 株分离株与韩国 C 型处在同一大的分支, 亲缘关系较近, 从图中可以看到, 分离株与中国 JS2010、C-YCW 分离株处于较小的分支上, 亲缘关系最近, 但为不同小分支, 表明这些新型分离株与中国分离株 JS2010、C-YCW 存在一定差异性, 与 DHV-B、DHV-A 处于不同的分支(图 2)。分离株的 VP0 基因序列表明, 7 株流行株(1、3、4、5、7、8、10 号)之间的同源性在 98.6%~100%(图 3), 与韩国 C 型的同源性在 95.4%~95.9%, 与中国分离株 C-YCW 的同源性 98.3%~98.9%, 与台湾型的同源性在 74.8%~75.6%, 与传统 1 型 A66 的同源性仅为 73.3%~73.8%。所以, 分离的 7 株流行株均为 DHV-C。

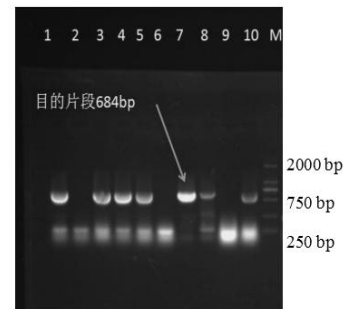


图 1 M:2000 bp Marker, 1-10 为检测样品  
Fig.1 M:DL2000 bp Marker, 1-10:samples

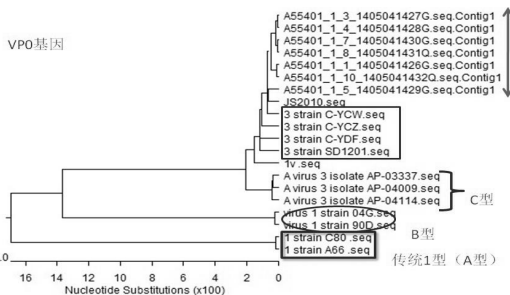


图 2 分离株与参考株的遗传进化分析

Fig.2 Evolutionary analysis on isolated and check strains

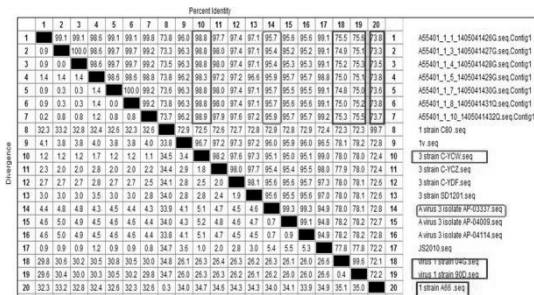


图 3 分离株与参考株的同源性分析

Fig.3 Homologous analysis on isolates and check strains

### 3 讨论

(1) 新型鸭病毒性肝炎的临床症状、剖检病变以及组织病理学变化与经典的 DVH 基本相似, 很难从这些方面对 DHV 的血清型进行鉴别诊断。

(2) 从发病日龄上看, 有的鸭群在 27、30 日龄时发病, 与以往的经典鸭病毒性肝炎相比, 发病日龄不仅仅局限在 3~21 日龄, 有延迟的趋势。

(3) 10 份具有肝脏出血、死后角弓反张症状的病例中, 有 3 份为阴性, 可能与黄曲霉素中毒或坦布苏病毒感染有关, 因为进一步检测有些鸭饲料黄曲霉毒素严重超标, 并检测到鸭坦布苏病毒感染。

(4) 2002 年, 苏敬良等从北京发病的北京雏鸭和广西樱桃谷病死鸭中分离到 2 株与 1 型鸭病毒性肝炎病毒无血清学相关性的病毒, 将其暂定为新型鸭病毒性肝炎病毒 (N-DHV)<sup>[10]</sup>。2006 年, 刘建等从北京、河北、山东和广西等地送检并具有明显的肝脏出血病变特征的雏鸭肝脏中分离到 9 株病毒株, 通过对其进行血清学鉴定, 发现其中 7 株为新型鸭病毒性肝炎病毒, 2 株为 1 型鸭病毒性肝炎病毒<sup>[11]</sup>。本次的调查结果表明, 山东省大多数地区由以前流行的经典 DHV-A 已经转变成 DHV-C, 而多数疫苗或卵黄抗体是针对过去广泛流行的 DHV-A (如 A66、C80 等), 这也解释了用传统的鸭病毒性肝炎弱毒疫苗或卵黄抗体无法预防该病的主要原因。

(5) 虽然本次检测到的鸭病毒性肝炎毒株均为 DHV-C, 但是并不代表山东省只存在该型鸭病毒性肝炎病毒, 也可能存在经典鸭病毒性肝炎病毒。因为大多数肉鸭养殖场都使用 A 型鸭病毒性肝炎弱毒苗或者卵黄抗体, 经典毒株已得到基本控制, DHV-C 已成为优势流行毒株。

(6) 2008 年, 朱明霞等曾对淄博市 8 个区县的 218 例鸭病毒性肝炎病例进行调查分析, 结果发现, 鸭群病毒性肝炎病占鸭发病数的 42.5%, 发病率为 15.7%~22.7%, 死亡率为 11%~14%<sup>[13]</sup>; 2012 年, 朱俊平等对潍坊地区 22 个鸭病毒性肝炎的鸭群进行调查发现, 发病率 3%~70.7%, 病死率为 8.6%~70.3%<sup>[14]</sup>。由上可见, 目前, 鸭病毒性肝炎仍然是危害鸭群的最主要疫病, 经济损失惨重, 应该予以重视。

### 参考文献

- [1] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, *et al.* Recent Korean isolates of duck hepatitis of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains, virus reveal the presence[J]. *Arch Virol*, 2007,152:2059-2072
- [2] Liu Ming, Meng Fanyi, Li Xiao-jun, *et al.* Goose haemorrhagic hepatitis caused by a new subtype duck hepatitis type 1 virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011,152:280-283
- [3] Monroe SS, Carter MJ, Herrmann J, *et al.* Family Astroviridae//Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, *et al.* Virus taxonomy. eighth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. London:Elsevier/Academic Press, 2005:859-864
- [4] 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 [J]. *Avian Pathol*, 2009,38(1):21-29
- [5] Saif YM.禽病学[M].11版.苏敬良,高福,索勋,译.北京:中国农业出版社,2005:376-389
- [6] 郭玉璞,蒋金书.鸭病[M].北京:北京农业大学出版社,1988:30-31
- [7] Asplin FD. Duck hepatitis: vaccination against two serological type[J]. *Vet Rec*, 1965,77(50):1529-1530
- [8] Levine PP, Fabricant J. A hitherto- undescribed virus disease of ducks in North America[J]. *Cornell Vet*, 1950,40:71-86
- [9] Toth TE. Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis[J]. *Avian Dis*, 1969,13(4):834-846
- [10] 苏敬良,黄瑜,贺荣连,等.新型鸭病毒性肝炎病毒的分离及初步鉴定[J].*中国兽医科技*,2002,32(1):15-16
- [11] 刘建,苏敬良,张克新,等.新型鸭病毒性肝炎病毒流行病学调查及免疫防治试验[J].*中国兽医杂志*,2006,42(2):3-6
- [12] 韦天超,黄泽琳,兰奉瑜,等.广西新型鸭病毒性肝炎病毒分离鉴定及 VP1 基因研究初报[J].*广西畜牧兽医*,2012,28(2):98-99
- [13] 朱明霞,王桂英,牛钟相,等.淄博地区鸭病毒性肝炎的流行病学调查[J].*动物医学进展*,2009,30(10):59-62
- [14] 朱俊平,薛梅.山东省潍坊市鸭病毒性肝炎的流行病学调查[J].*中国动物检疫*,2014,31(12):50-54