

焦凤超, 李鑫鑫, 李迎晓, 等. 鸭甲型肝炎病毒 3 型信阳株的分离鉴定及遗传演化分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 80-87.

JIAO F C, LI X X, LI Y X, et al. Amplification and phylogenetic analysis of duck hepatitis A virus type 3 Xinyang strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 80-87.

鸭甲型肝炎病毒 3 型信阳株的分离鉴定及遗传演化分析

焦凤超^{1#}, 李鑫鑫^{2#}, 李迎晓¹, 雷震³, 董建国¹,
赵瑜¹, 何书海¹, 赵聘¹, 曲哲会^{1*}, 黄立^{1*}

(1. 信阳农林学院/河南省水禽资源开发利用与疫病防控工程技术研究中心, 河南 信阳 464000;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 北京 102206)

摘要: 为了解信阳地区鸭甲型肝炎病毒 3 型的遗传变异特性, 对信阳市发生疑似肝炎的金定雏鸭进行 9 种常见病毒 PCR/RT-PCR 检测, 同时采集病鸭肝脏组织无菌处理后, 尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸭胚进行病毒分离, 并对分离毒株进行全基因组和 VP1 基因序列分析。结果: 成功分离到 1 株鸭甲型肝炎病毒 3 型 (DHAV3), 命名为 HNX Y23; 接种病毒的鸭胚发育不良, 死亡胚体全身呈出血水肿; 序列比对和系统发育树表明, 分离株 HNX Y23 属于 DHAV3 G I 基因型, 与 2022 年分离株 HB-1、HZ-1、HZ-2 和 HZ-3 亲缘关系较近; 利用 DNAMAN 软件比对 31 株 DHAV3 VP1 氨基酸位点变异情况, 发现在 184、187、195、206 和 209 位这 5 个氨基酸位点有较为明显的变化差异。本研究结果丰富了信阳地区 DHAV3 的分子流行病学资料, 为进一步研究 DHAV3 的致病机制奠定了基础。

关键词: 鸭甲肝病毒 3 型; VP1 基因; 遗传进化分析; 重组分析

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0080-08

Amplification and phylogenetic analysis of duck hepatitis A virus type 3 Xinyang strain

JIAO Fengchao^{1#}, LI Xinxin^{2#}, LI Yingxiao¹, LEI Zhen³, DONG Jianguo¹,
ZHAO Yu¹, HE Shuhai¹, ZHAO Pin¹, QU Zhehui^{1*}, HUANG Li^{1*}

(1. Xinyang Agricultural and Forestry University/Henan Province Engineering Technology Research Center for Waterfowl Resources Development and Utilization and Epidemic Disease Prevention and Control, Xinyang 464000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention/National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: In order to understand the genetic variation characteristics of duck hepatitis A virus type 3 (DHAV3) in the Xinyang area, PCR/RT-PCR was used to detect 9 common viruses in Jinding ducklings with suspected hepatitis in Xinyang City. After aseptic treatment of the liver tissue samples of diseased ducks, 10-day-old SPF duck embryos were inoculated in allantoic cavity for virus isolation, and whole genome and VP1 gene sequence analysis were carried out. The results showed that a DHAV3 strain was successfully isolated and named HNX Y23. The duck embryos inoculated with the virus showed dysplasia, and the dead embryos showed hemorrhage and edema. Sequence alignment and phylogenetic tree showed that HNX Y23 belonged to the DHAV3 G I genotype, and it had a close relationship with the isolates

收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2024-07-29

基金项目: 信阳市创新应用专项 (20200016); 信阳农林学院重要水禽源病原致病与免疫机制研究科技创新团队项目; 信阳农林学院家禽疫病防控科技服务团队项目

第一作者: 焦凤超, 男, 硕士, 副教授; 李鑫鑫, 女, 硕士研究生。#为共同第一作者

*通信作者: 曲哲会, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒致病与免疫机制方面的研究, E-mail: quzhehui1980@sina.cn; 黄立, 教授, 主要从事病原微生物与免疫学方面的研究, E-mail: cnvet@126.com。

HB-1, HZ-1, HZ-2 and HZ-3 in 2022. Then, the DNAMAN software was used to compare the amino acid site variation of VP1 of 31 DHAV3 strains, and it was found that there were significant differences in five amino acid sites such as 184, 187, 195, 206 and 209. The results of this study enriched the molecular epidemiological data of DHAV3 in the Xinyang area, and it laid a foundation for further research on the pathogenic mechanism of DHAV3.

Keywords: duck hepatitis A virus type 3; VP1 gene; phylogenetic analysis; recombination analysis

鸭甲型病毒性肝炎是由微 RNA 病毒科、禽肝病病毒属的鸭甲型肝炎病毒 (duck hepatitis A virus, DHAV) 引起的一种急性、高度致死性传染病, 主要感染 4 周龄以内的雏鸭^[1]。DHAV 是鸭病毒性肝炎病毒的主要病原之一。根据国际病毒分类委员会最新的分类标准, DHAV 被分为 DHAV1、DHAV2 和 DHAV3 三个基因型 (或血清型)^[2-5], 交叉保护试验表明, 各型之间基本无交叉保护力, 或血清学关系不明确 (DHAV2 型和 DHAV3 型)^[6]。

DHAV 无囊膜, 其基因组符合微 RNA 病毒基因组特征, 大小约为 7.8 kb, 由两侧的非编码区 (UTR)、一个长的开放阅读框 (ORF)、3' 端非编码区末端的 Poly (A) 组成, ORF 编码的多聚蛋白可以被裂解为 12 个成熟产物。基因组结构为 5' UTR-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2A3-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3' UTR^[7], 其中 VP1 是 DHAV 最主要的结构蛋白, 具有诱导保护性抗体与细胞受体结合的功能^[8]。

目前, 在我国 DHAV1 和 DHAV3 呈现共流行, Zhou 等^[9]对 2009—2021 年中国大陆鸭甲型肝炎病毒流行情况进行分析发现, DHAV 在中国大陆的发病率为 12%、致死率为 11%, 时间分析表明, DHAV 发病率随时间呈下降趋势。临床样本流行病学统计资料表明, DHAV1 阳性样本占比 38%, DHAV3 占比 49%, 并且 DHAV3 正逐渐取代 DHAV1 成为优势基因型^[10-11]。因此, 开展 DHAV3 分子流行病学、病原致病性、免疫机制及高效疫苗研究已迫在眉睫。本研究对信阳市发生疑似肝炎的金定雏鸭进行病原检测和病毒全基因组测序, 与 GenBank 中已公布的部分 DHAV3 参考毒株序列进行了同源性比对和重组分析, 为进一步研究 DHAV3 的遗传进化、致病性以及免疫防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料与鸭胚

肝脏病料于 2023 年 1 月采集自信阳市平桥区某散户养殖场疑似感染鸭病毒性肝炎的 7 日龄金定雏鸭。患鸭发病初期可见精神萎靡、采食量下降、腹泻等情况, 后期逐渐出现扭头、抽搐、角弓反张等神经症状, 发病率约 20%, 死亡率约 30%。剖检病死鸭可见肝脏肿大, 有点状或斑状出血。SPF 鸭胚购自中

国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.2 主要试剂

FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit Pro、2×Rapid Taq Master Mix、2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)、5 min TOPO-Blunt Cloning Kit、DL2000 plus DNA Marker 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司; DL2000 DNA Marker、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 样品采集和病原检测

取 100 mg 病鸭肝脏, 加入 1 mL 无菌 PBS 充分匀浆后, 离心取 300 μ L 上清液, 依照试剂盒说明书提取病毒 DNA/RNA。参考文献 [12-14] 方法进行鸭坦布苏病毒 (DTMUV)、禽腺病毒血清 4 型 (FAdV4)、新型鹅细小病毒 (NGPV)、H9N2 亚型禽流感病毒 (H9N2 AIV)、新城疫病毒 (NDV)、鸭圆环病毒 (DuCV)、鸭呼肠孤病毒 (DRV)、DHAV1 和 DHAV3 的 PCR/RT-PCR 检测, 引物信息见表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 PCR/RT-PCR 检测引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
H9N2-AIV-F	GGGAGTGTATGGGTGATCAA	559
H9N2-AIV-R	ACAGAAGATGAGGACAGCGT	
NGPV-F	GACTTAGACAGGCTTATGAAC	781
NGPV-R	ATTGCTGCTGAACTGGATT	
DRV-F	TGCCGATGGACCTAATCCT	369
DRV-R	TTCGCCATACCTACTTCGT	
DTMUV-F	ACGAGATAGTCACCTGGGTGATG	255
DTMUV-R	GAAACGGTTGCGACCGACG	
NDV-F	CTGCACATAGAAGAGGAGCTA	427
NDV-R	CTGGTCTGCTAGTTCATGG	
DuCV-F	TGGGGACCACTCATACGATT	449
DuCV-R	ATGCCGTGAGAGTTGACGACT	
FAdV4-F	AGCTGGAGGGAAAGAGGATT	884
FAdV4-R	TCCAATCGCGTTTAAGCTATCG	
DHAV3-F	GAAATCTGCACTCAATGGAGAG	306
DHAV3-R	CCCAGGAAATGATTGCTCAG	
DHAV1-F	GGAGGTGGTCTGAAATAT	214
DHAV1-R	CATGTGCTGGACAGAT	

1.4 病毒分离鉴定

将组织匀浆液冻融 3 次离心取上清液，加 5% 体积的青霉素-链霉素双抗处理，用针式过滤器 (0.22 μm) 除菌后通过尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸭胚，弃去 24 h 内死亡鸭胚，收获 48~120 h 内死胚以及 120 h 后处死的鸭胚，收集尿囊液备用^[15]，采用 1.3 方法对收集到的尿囊液进行 DHAV 的 RT-PCR 检测。

1.5 DHAV3 全基因组扩增

1.5.1 引物设计

参照文献 [15-16] 合成 DHAV3 病毒全基因组分段扩增引物，具体信息见表 2。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 2 DHAV3 全基因组 PCR 扩增引物

引物名称	核苷酸序列 (5'→3')	片段长度/bp	退火温度/℃
P1-F	TTTGAAAGCGGCTGTGGTGTAGACC	1 594	55
P1-R	TGTTGACTAGTCAACTGCAGTACCC		
P2-F	CAAATCTATCCAATTCTAGTGTGGT	1 560	56
P2-R	TCAATTAGGGTCACTTGCTTGTAC		
P3-F	ATTATGGTTGTTGCTAAATCAGGAT	1 586	54
P3-R	AAAATTGACCTGCTGGAGCTTATTT		
P4-F	TCTAACACTTTGAATCAATTAATG	1 573	55
P4-R	AGAATTTTTAGGTTTCTCCAACAA		
P5-F	CAGRGTGGTCGTGTAATTTTC	1 532	57
P5-R	CGCTTCTCAGGCACAGACA		
P6-F	GCCGGTATGTGCTCAGGAT	936	55
P6-R	TTTAGGGTGGGAGGAAT		

1.5.2 目的片段的分段扩增

参照反转录说明书扩增病毒 cDNA，以 cDNA 为模板，进行 P1~P6 基因扩增。扩增体系为：上、下游引物各 2 μL ，2 \times Phanta Flash Master Mix 25 μL ，cDNA 1 μL ，RNase free H₂O 20 μL 。扩增程序：98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s；98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，退火 5 s (退火温度见表 2)，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。

1.6 扩增产物的序列分析

将分段基因的胶回收产物分别连接 5 min TOPO-Blunt Cloning Kit，将重组质粒用 M13F/R 引物 PCR 检测无误后送检测序，序列拼接后利用 DNASTar、DNAMAN 和 MEGA 11.0 软件与 GenBank 中公布的 30 株 DHAV3 序列进行全基因组和 VP1 基因 (推导氨基酸) 序列比对和遗传进化树的构建，并分析 VP1 基

因氨基酸突变位点。参考病毒序列信息见表 3。

表 3 参考分离株序列信息

分离株	分离时间	分离地	宿主	GenBank 登录号
G	1999	中国	樱桃鸭	EU755009.1
JT	2011	中国	鹅	JF835025.1
JS2010	2010	中国	鸭	HQ654774.1
SD70	2013	中国	鸭	MN953475.1
LSD120225	2010	中国	鸭	MK371024.1
GD	1999	中国广东	鸭	GQ122332.1
FS	2008	中国广东	鸭	EU877916.1
B-N	2011	中国广东	鸭	JX235698.1
C-GY	2010	中国广东	鸭	EU353005.2
1v	2009	中国山东	鸭	GU250782.1
EY	2014	中国山东	鸭	KP995438.1
SD1201	2011	中国山东	鸭	KCC993890.1
CH	2015	中国山东	鸭	MH752739.1
SD	2011	中国山东	鸭	MN953474.1
CH-P10	2015	中国四川	鸭	MH752740.1
B63	2008	中国北京	鸭	EU747874.1
C-YCW	2009	中国北京	鸭	GU066824.1
C-YCZ	2005	中国北京	鸭	GU066823.1
C-YDF	2009	中国北京	鸭	GU066821.1
JS	2017	中国江苏	鸭	MN164467.1
NT	2013	越南	鸭	KU860090.1
NC	2009	越南	鸭	KU860089.1
AP-04203	2003—2004	韩国	鸭	DQ256134
AP-03337	2003—2004	韩国	鸭	DQ256132
AP-04009	2003—2004	韩国	鸭	DQ256133
AP-04114	2003	韩国	鸭	DQ812093
HB-1	2022	中国	鸭	OP575303.1
HZ-1	2022	中国	鸭	OP575304.1
HZ-2	2022	中国	鸭	OP575305.1
HZ-3	2022	中国	鸭	OP575306.1

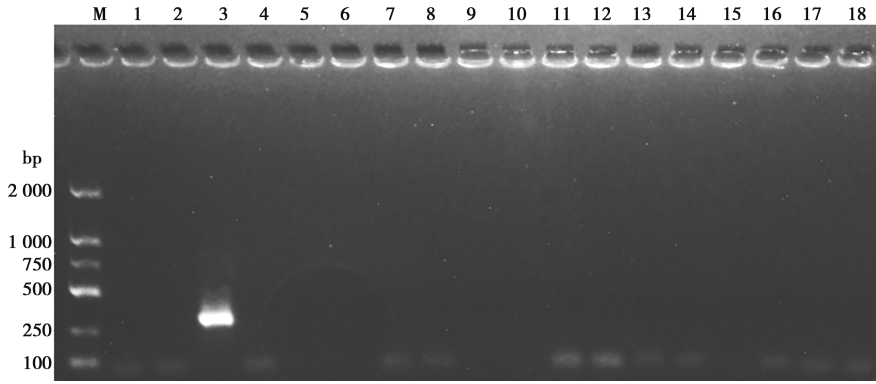
1.7 病毒重组分析

利用 RDP4 软件和 Simplot 软件分析 HNX23 株全基因组和 VP1 基因可能存在的重组信号，确认病毒基因重组事件。

2 结果

2.1 病原检测

发病鸭组织病料提取的病毒基因组进行 PCR/RT-PCR 检测，结果显示只有 DHAV3 扩增出阳性条带，其他病毒均为阴性 (图 1)。



M. DNA Marker DL2000; 1. DHAV1; 3. DHAV3; 5. DRV; 7. DTMUV; 9. NDV; 11. DuCV; 13. FAAdV4; 15. NGPV; 17. H9N2 AIV; 2、4、6、8、10、12、14、16、18. 阴性对照。

图1 疑似病料 PCR/RT-PCR 检测

2.2 病毒的分离与鉴定

SPF 鸭胚接种组织毒后部分胚胎死亡。死胚表现为全身红肿（图 2），皮下明显充血、出血，肝脏明显出血。

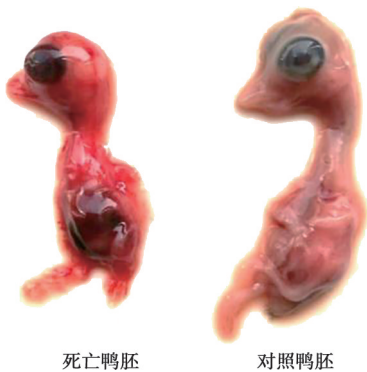


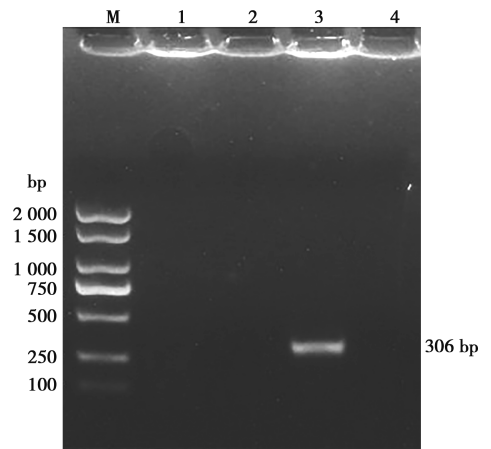
图2 死亡鸭胚病理变化

尿囊液 DHAV3 的 RT-PCR 检测结果显示，成功扩增出一段约为 306 bp 的目的条带，与预期相符（图 3），初步确定分离病毒为 DHAV3，命名为 HNX Y23。

2.3 全基因组扩增与序列分析

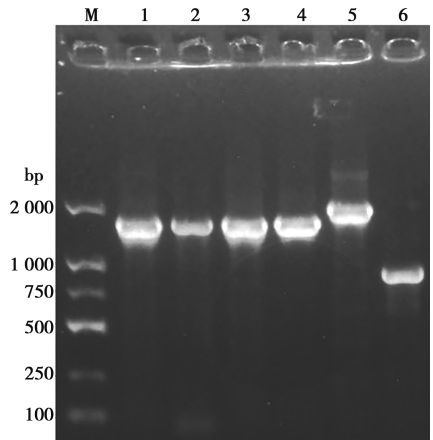
2.3.1 全基因组扩增

利用 P1~P6 共 6 对引物成功扩增出 6 个预期目的片段，如图 4 所示。序列拼接后的全基因组全长为 7 779 bp（GenBank 登录号：OR666647），5'UTR 长度为 652 bp，3'UTR 长度为 366 bp，ORF 位于 653~7 408 bp 之间，符合 DHAV3 基因组结构特征。



M. DL2000 plus DNA Marker; 1. DHAV1; 3. DHAV3; 2、4. 正常鸭胚尿囊液对照。

图3 尿囊液 RT-PCR 检测



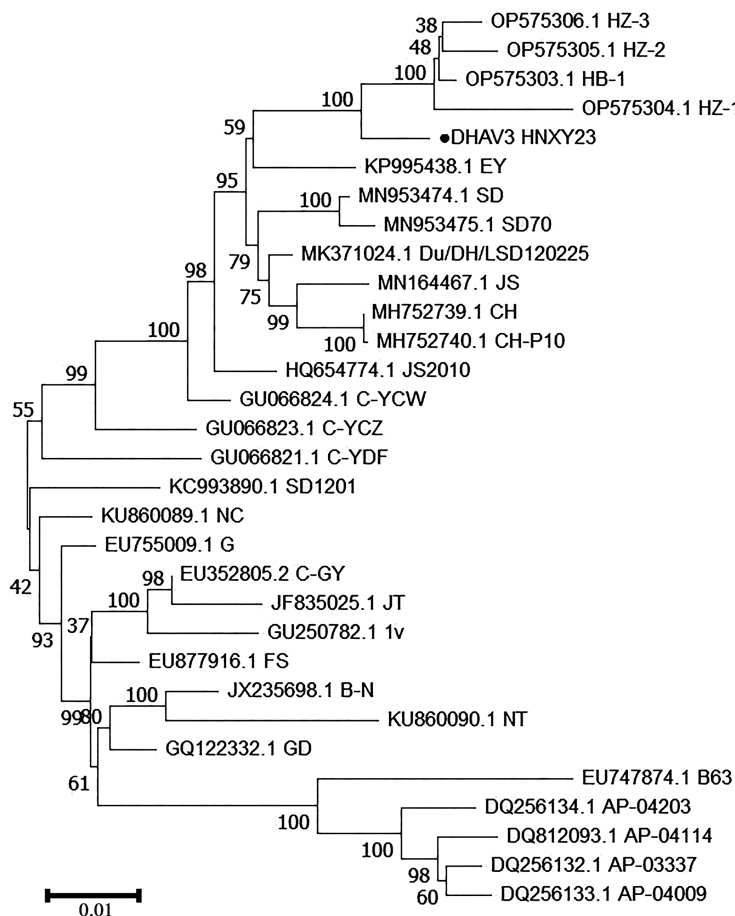
M. DNA Marker DL2000; 1~6. P1~P6 分段基因。

图4 HNX Y23 株全基因组分段扩增

2.3.2 全基因组序列分析

应用 MegAlign 工具中的 Clustal W 方法，将 HNX Y23 株与 GenBank 中登录的 30 株参考毒株进行全基因组核苷酸序列的同源性分析。全基因组序列分析结果显示，HNXY23 株与其他 30 株全基因组核苷酸的同源性为 93.2%~98.5%。其中与分离株 HB-1 和 HZ-3 株同源性最高为 98.5%，与 HZ-1 株、HZ-2 株同源性稍低为 98.1%~98.4%，与疫苗强毒株

B63 的同源性最低为 93.2%。系统发育树分析显示 (图 5)，31 株毒株分为了两大分支，HNXY23 株与 HZ-1 株、HZ-2 株、HZ-3 株和 HB-1 株处于同一小分支上，并与山东分离株 EY 处于一个大分支中。而 HNX Y23 株与 4 株经典的韩国毒株 (AP-03337、AP-04114、AP-04009、AP-04203) 和疫苗强毒株 B63 处于不同分支，差别较大，同源性较低。



注：●表示本试验分离株，下同。

图 5 基于全基因组序列的 HNX Y23 株遗传演化分析

2.4 VP1 基因及推导氨基酸序列分析

VP1 基因遗传进化树分析显示，所有 DHAV3 病毒株分为 2 个基因型 (图 6)。其中 G I 型包括大部分中国分离株、小部分越南分离株，G II 型包括韩国经典毒株、中国疫苗株 B63，本研究中 HNX Y23 株位于 G I 型的一个小分支上，与 2022 年 HZ-1 株、HZ-2 株、HZ-3 株和 HB-1 株处于同一分支上，亲缘关系较近。

VP1 氨基酸同源性比对表明，HNXY23 与其他 30 株分离株 VP1 氨基酸同源性为 91.7%~99.6%，

与 HZ-1 株、HZ-3 株相似性最高为 99.6%。VP1 蛋白遗传进化树显示，DHAV3 具有明显的地域特征性，31 株毒株分为了两大分支，HNXY23 株与 HZ-1 株、HZ-2 株、HZ-3 株和 HB-1 株处于 G I 型的同一小分支上 (图 7)。利用 DNAMAN 软件比对 31 株 DHAV3 VP1 氨基酸位点变异情况，共发现 38 处氨基酸位点存在差异性。其中位于 VP1 羧基端的 181~209 位氨基酸处于高变区，共有 5 个较为明显的氨基酸突变，分别位于 184、187、195、206、209 位氨基酸位点 (图 8)。

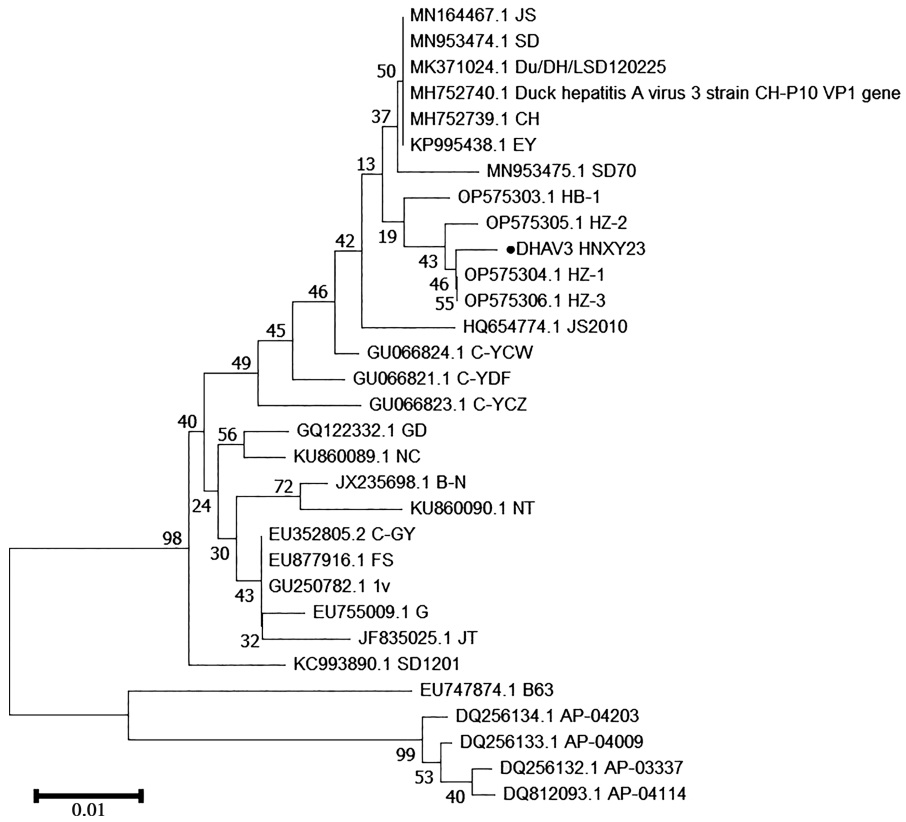


图 6 基于 VP1 基因序列的 HNX Y23 株遗传演化分析

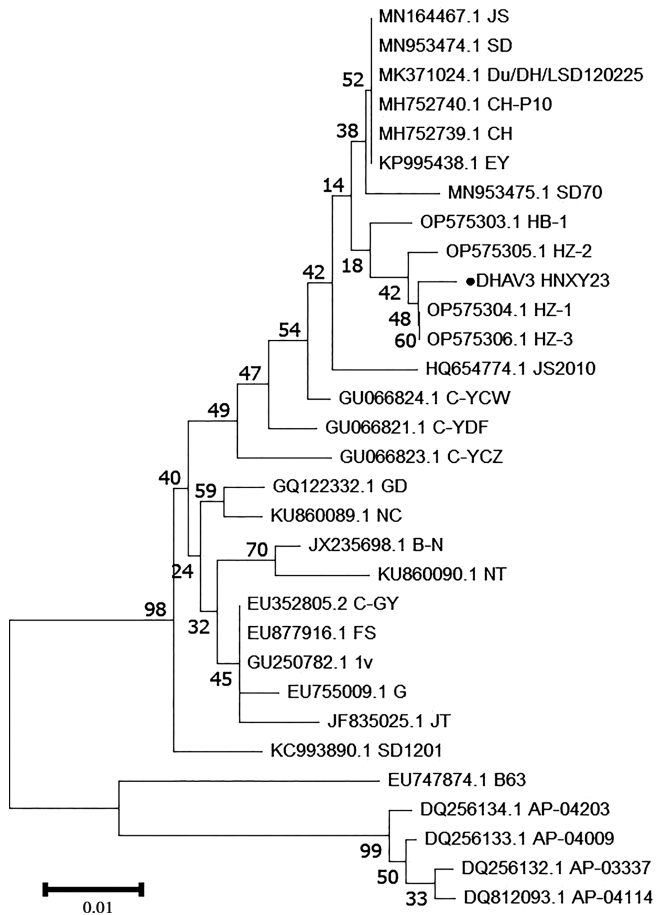


图 7 基于 VP1 氨基酸序列的 HNX Y23 株遗传演化分析

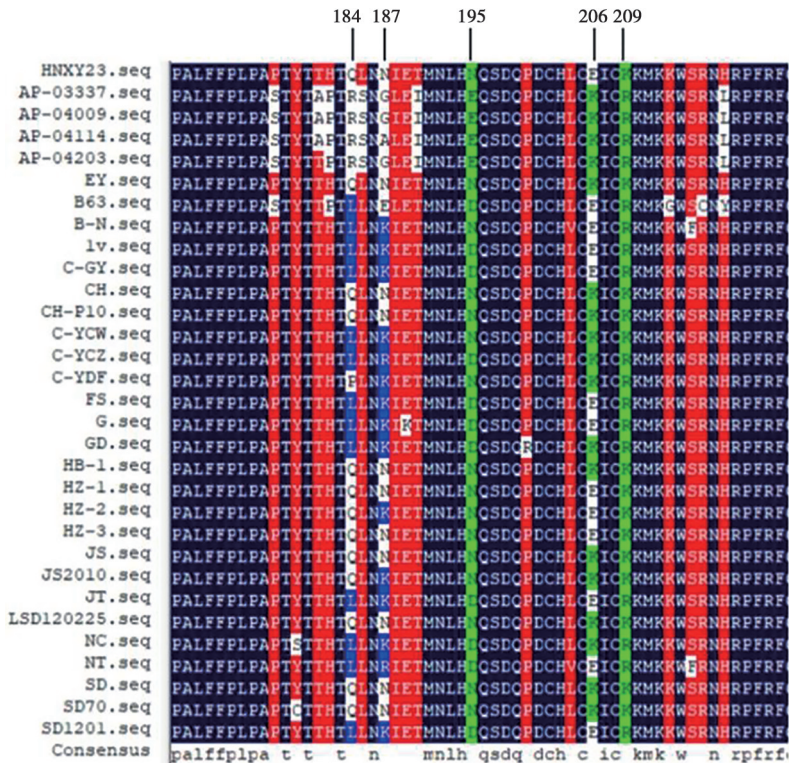


图 8 VP1 蛋白氨基酸序列变异位点

2.5 基因重组分析

利用 RDP4 软件和 SimPlot 3.5.1 软件将 HNX Y23 株与 30 株参考病毒全基因组序列进行分析, 结果未发现重组信号。

3 讨论

DHAV1 呈世界流行, DHAV2 分布在中国台湾和印度, DHAV3 则主要发生在韩国、越南、中国、埃及等国家^[17-18], 目前, 我国 DHAV1 和 DHAV3 呈现共流行, 使该病成为养鸭业最为危害严重的疾病之一。自 2013 年以来, 得益于 DHAV1 商品化疫苗的应用, DHAV1 阳性病例逐年减少, 相反, DHAV3 的检出率逐年升高。截止到 2023 年 8 月, 我国商品化 DHAV3 活疫苗尚属空白。胰腺型 DHAV1 引起的成年鸭产蛋下降、鹅出血性肝炎以及病毒垂直传播等特点赋予了鸭甲型病毒性肝炎新的流行病学特征^[19-22], 值得进一步关注。信阳市地处大别山革命老区, 水禽资源丰富, 养殖历史悠久, 依靠特色养殖实现乡村振兴是当地政府的一项重要举措, 常发、危害严重的病毒性疫病的有效防控是维护养殖效益的重要因素。本研究对信阳地区疑似鸭甲型肝炎病毒病例进行病毒分离和 RT-PCR 鉴定, 确认了 DHAV3 毒株在信阳地区的流行, 为 DHAV3 感染的防控提供了依据。

病毒基因重组是病毒演化中的一种重要机制。无论是全基因组序列分析还是结构蛋白 VP1 序列分析,

HNX Y23 株均与 2022 年分离株 HZ-1、HZ-2、HZ-3 和 HB-1 亲缘关系最近。通过 Simplot 对 HNX Y23 进行病毒重组分析未发现可能的重组信号。研究人员证实了 DHAV 存在基因重组现象, Wei 等^[23] 2011 年从我国广东 DHAV1 和 DHAV3 混合感染鸭群中分离到的 1 株鸭甲型肝炎病毒 B-N, 分析发现其可能是 DHAV1 和 DHAV3 发生基因重排的重组毒株。Fehér 等^[24] 研究表明, DHAV 易发生基因型间重组, 揭示了存在于 DHAV1 基因型内的重组以及 DHAV1 和 DHAV3 基因型间的重组事件。因此, 持续开展水禽鸭甲型肝炎病毒的基因组流行病学研究对于了解病毒演化和疾病监测至关重要。

研究发现, 某些 RNA 病毒基因组的 5'-UTR 存在核糖体进入位点 (internal ribosome entry sites, IRES) 结构, 可以调控蛋白质起始翻译。在 IRES 元件 3'端存在一个保守的顺式作用元件 Yn-Xm-AUG 基序。Yn 为嘧啶富集区, Xm 为间隔区, 长度为 15~25 nt, 其次为 AUG^[23,25]。序列分析发现, HNX Y23 的翻译起始位点位于 653 位一个最优的 Kozak 位点 (GCAAUGG), 在其上游存在一个保守的顺式作用元件 Y6-X66-AUG 基序, 与 Wei 等^[23] 研究结果相同。

VP1 蛋白是 DHAV 的关键结构蛋白, 能够诱导机体产生特异性中和抗体, 与病毒基因型和血清型的多样性相关^[26]。郭程程^[27] 探究了 DHAV3 在 SPF 鸡胚上传代致弱过程中 VP1 蛋白氨基酸变化规律, 发

现虽然不同毒株、不同代次病毒 VP1 蛋白的氨基酸变异位点都发生了反复变异和同步变异,但不存在相同规律,说明 DHAV3 的传代致弱与 VP1 蛋白突变没有直接关系。马秀丽等^[28]分析了实验室保存的 DHAV1 和 DHAV3 的遗传和抗原稳定性,结果发现,虽然部分 DHAV1 和 DHAV3 代表株的 VP1 氨基酸序列分别存在 5 处和 9 处位点变异,但这些改变没有影响 DHAV1 或 DHAV3 的中和特性,在同一血清型之间仍然具有较好的交叉保护作用。文兴建^[29]跟踪研究了 DHAV3 毒株在鸭胚连续传代 60 代后突变规律和毒力变化,发现 VP0 蛋白 Y164N 突变和 2C 蛋白 L71I 突变是 DHAV3 强毒致弱的分子基础。本研究将 HNX Y23 株与其他 30 株 DHAV3 VP1 氨基酸序列进行比较,发现这些毒株有 38 处氨基酸位点存在差异性,与疫苗株 B63 相比,HNXY23 株存在 T96M、S122N、S177P、P182H、L184Q、E187N、R199K、G213K、C216R、Y218H 等 10 个氨基酸变异位点。值得注意的是,不同于其他 DHAV3 参考毒株,HNXY23 VP1 蛋白 A139S 位点的独特变异值得关注,这是否会影响 DHAV3 的毒力和免疫原性有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 苏敬良,黄瑜,胡薛英.鸭病学[M].北京:中国农业大学出版社,2016:154-173.
- [2] 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 (11): 3307-3316.
- [3] DING C, ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 [J]. *Virol*, 2007, 361 (1): 9-17.
- [4] 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 (2): 190-203.
- [5] 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 (1): 52-59.
- [6] 卢荣辉,刘小龙,肖隆华,等.鸭甲型病毒性肝炎最新研究进展[J].福建农业学报,2017,32(3):336-341.
- [7] 吴敏.鸭甲型肝炎病毒血清 3 型弱毒疫苗株的筛选[D].重庆:西南大学,2022.
- [8] LI X, ZHAO R, LIN W, et al. Evidence of VP1 of duck hepatitis A type 1 virus as a target of neutralizing antibodies and involving receptor-binding activity [J]. *Virus Res*, 2017, 227: 240-244.
- [9] ZHOU S, LI S, WANG Y, et al. Duck hepatitis A virus prevalence in mainland China between 2009 and 2021: A systematic review and meta-analysis [J]. *Prev Vet Med*, 2022, 208: 105730.
- [10] ZHANG R, XIA L, CHEN J, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of duck hepatitis A virus type 3 in Shandong Province of China, 2012-2014 [J]. *Acta Virol*, 2017, 61 (4): 463-472.
- [11] WEN X, ZHU D, CHENG A, et al. Molecular epidemiology of duck hepatitis a virus types 1 and 3 in China, 2010-2015 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (1): 10-15.
- [12] 杨晶,张日腾,王振忠,等.我国部分地区鸭病毒性疫病共感染的流行病学调查[J].中国兽医学报,2018,38(10):1872-1877.
- [13] 刘鹏,汪磊,毛晓惠,等.2株鸭源新型鹅细小病毒分离鉴定及遗传进化分析[J].中国家禽,2021,43(5):33-40.
- [14] CHEN X, CHEN Y, LIU C, et al. Improved one-tube RT-PCR method for simultaneous detection and genotyping of duck hepatitis A virus subtypes 1 and 3 [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (8): e0219750.
- [15] 张玉倩,姚鑫炎,杨惠湖,等.2株3型鸭甲肝病毒广东分离株的鉴定与遗传进化分析[J].黑龙江畜牧兽医,2022(24):69-75.
- [16] 向萌,张焕容,岳华,等.四川地区4株基因C型鸭甲肝病毒的分离鉴定及全基因组测序分析[J].中国预防兽医学报,2021,43(1):14-20.
- [17] ZHANG Y, WU S, LIU W, et al. Current status and future direction of duck hepatitis A virus vaccines [J]. *Avian Pathol*, 2023, 52 (2): 89-99.
- [18] RAJENDRAN R, SRINIVASAN J, NATARAJAN J, et al. First report of duck hepatitis A virus genotype 2 in India [J]. *Vet Res Commun*, 2023, 10.1007/s11259-022-10063-0.
- [19] 傅光华,陈红梅,黄瑜,等.雏番鸭腺型鸭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.
- [20] ZHANG R, CHEN J, ZHANG J, et al. Novel duck hepatitis A virus type 1 isolates from adult ducks showing egg drop syndrome [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221: 33-37.
- [21] ZHANG R, YANG Y, LAN J, et al. Evidence of possible vertical transmission of duck hepatitis A virus type 1 in ducks [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (2): 267-275.
- [22] LIU M, FAN Y M, LI X J, et al. Goose haemorrhagic hepatitis caused by a new subtype duck hepatitis type 1 virus [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 152 (3-4): 280-283.
- [23] WEI C Y, SU S, HUANG Z, et al. Complete genome sequence of a novel duck hepatitis A virus discovered in southern China [J]. *J Virol*, 2012, 86 (18): 10247.
- [24] FEHÉR E, JAKAB S, BALI K, et al. Genomic epidemiology and evolution of duck hepatitis A virus [J]. *Viruses*, 2021, 13 (8): 1592.
- [25] 傅美贤,龙健儿.病毒IRES的结构及IRES介导的蛋白质翻译研究进展[J].生命科学,2021,33(4):407-418.
- [26] 张帆帆,王维,饶煜玲,等.鸭甲型肝炎病毒的研究进展[J].中国兽医学报,2023,43(6):1350-1356.
- [27] 郭程程.3型鸭甲肝病毒在SPF鸡胚上的传代及VP1基因变异规律的研究[D].泰安:山东农业大学,2017.
- [28] 马秀丽,黄兵,李玉峰,等.鸭甲型肝炎病毒的遗传和抗原稳定性分析[J].中国动物传染病学报,2018,26(6):48-52.
- [29] 文兴建.3型鸭甲肝病毒致弱的分子基础[D].雅安:四川农业大学,2022.