

## 2008 年鴨病毒性肝炎病毒分離株之特性與序列分析

曾俊憲\*、施雨華、陳韋蘋、簡麗琴、黃天祥、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

**摘要** 台灣自 2008 年 6 月陸續爆發雛鴨大量死亡之疫情，自本次疫情中，共計分離 21 株病毒，經以序列分析及血清學鑑定結果為：18 株第一型鴨肝炎 A 病毒 ( Duck Hepatitis A Virus type 1, DHAV-1 ) 及 3 株 ICPI 分別為 1.75、1.31 及 0.175 之新城病病毒 ( Newcastle Disease Virus, NDV )。2008 年與 2003 年 DHAV-1 分離株於 VP1 之核酸及氨基酸相似性達 99.2%及 99.6%，與 5886 疫苗株相似性亦高達 92.3%及 95.4%。所有 DHV 分離株均可被 DHAV-1 標準血清完全中和，中和指數為 5.33 至 7.67，證實所有病毒株均為 DHAV-1。此外以 DHAV-1 活毒減毒疫苗肌肉注射免疫 1 日齡雛鴨，經 7 日後以 2008 年之病毒株進行攻毒，結果免疫組 100%耐過，對照組死亡率分別為 42.9%與 69.2%。根據以上分析，本次疫情為本土型 DHAV-1 再度爆發，並非病毒變異或其他血清型 DHV 入侵所造成。

**關鍵詞：**鴨肝炎病毒，新城病病毒，演化分析。

### 緒言

鴨病毒性肝炎 ( Duck Viral Hepatitis, DVH ) 是一種雛鴨的急性致死性疾病，感染鴨隻主要病理變化為肝炎，病原為鴨肝炎病毒 ( Duck Hepatitis Virus, DHV ) [4, 15]。DHV 依據病毒型態學與理化特性分析歸類於 picornavirus，進一步以血清學方法可區分成 DHV-I、II、III [2, 11]。以 DHV-I 分布最廣、病原性最強，感染 3 週齡以內雛鴨引發之死亡率可達 90% 以上。至於 DHV-II 及 DHV-III 分別只有英國及美國有病例

報告 [6, 15]。

近年來隨著各種病毒基因體核酸序列的完成，加諸採用演化分析、序列相似性及病毒基因體結構差異性作為病毒分類之依據，因此成立了許多全新的病毒屬。Picornavirus 中除了 Ljungan 病毒之基因體結構中同時存在 2 種 2A 基因，已知之 picornavirus 均只具有單一之 2A 基因。但 DHV-I 基因體卻同時存在 3 種不同的 2A 基因，所以 DHV-I 未來可能於 *Picornaviridae* 中成立一個全新的 *Avihepatovirus* 病毒屬 [12, 13]。原本 DHV-II 依據病毒型態學與理化特性分析結果歸類為

---

\*抽印本索取作者

picornavirus，但是隨著3D ( RNA dependent RNA polymerase, RdRp ) 部分核酸序列的特徵，已將 DHV-II 與 DHV-III 一併歸類於星狀病毒科 ( *Astroviridae* ) (10)。

2007年台灣、韓國及中國陸續發表新血清型鴨肝炎病毒 ( new serotype DHV, N-DHV ) 之基因序列及血清學相關文獻，證實N-DHV與DHV-I均屬於 *Avihepatovirus*，但彼此不具抗原相關性。依據上述結果將DHV-I再分類為DHAV-1、DHAV-2及DHAV-3三種血清型。DHAV-1即原本之DHV-I，DHAV-2及DHAV-3均屬於N-DHV，其中DHAV-2僅台灣有病例報告，DHAV-3目前僅發生於中國與韓國(3, 13, 14)。

自2008年6月開始，台灣中南部陸續發生3至16日齡雛鴨大量死亡之疫情，自送檢的21個病例中分離到18株DHV-I及3株NDV。本試驗藉由序列分析、中和指數、疫苗保護試驗及動物病原性試驗探討2008年分離株之特性與爆發疫情之原因。

## 材料與方法

### 材料：

1. 鴨隻檢體：係由中華民國養鴨協會或本所研究人員採集南投縣、彰化縣、雲林縣、高雄縣及屏東縣之3至16日齡鴨肝炎病例檢體，共計21場次。
2. 雞胚胎：購自農委會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所之8日齡SPF雞胚胎，供病毒分離。
3. 雛鴨：購自宜蘭黎明牧場無DHAV-1抗體1日齡雛鴨，供疫苗效力試驗使用。

### 方法：

1. 病毒分離：將送檢鴨隻肝臟及腸管分別作成10-20%乳劑，經離心( 2330×g, 30 min, 4°C )後，以上清液接種於8日齡SPF雞胚胎尿囊腔，收集接種後2至5日死亡雞胚胎之尿囊液及胚胎，供後續試驗使用。
2. 陽性血清製備：分別將5886疫苗株及2008年野外分離株以每劑量  $10^{6.0-7.0}$  EID<sub>50</sub>，經肌肉注射方式免疫1日齡SPF雞，連續免疫3次，每次間隔一週。第3次免疫後1週，經心臟採血製備高

免血清，使用前以56 °C非動化處理30分鐘。

3. 中和指數：依照OIE標準方法操作(7, 9)，2008年DHAV-1分離株行10倍連續稀釋後，加入等量經10倍稀釋之DHAV-1 5886陽性血清，於37 °C作用60分鐘。每一稀釋倍數之血清 - 病毒混合液，接種4顆8日齡SPF雞胚胎尿囊腔，經連續7日觀察後，血清 - 病毒混合液需較陰性血清對照組之病毒力價下降達 $10^{2.0}$  ( NI≥2.0 ) 以上，才可以判定為DHAV-1。
4. RT-PCR：依照QIAamp® Viral RNA Mini Kit ( QIAGEN Ltd., Hilden, Germany ) 使用方法及步驟進行核酸萃取及純化。分別以0720/1D及ND370F引子進行DHAV-1 VP1全長及NDV F基因部分核酸增幅(12)。
5. 序列分析：以MegAlign程式 ( LaserGene; DNASTar ) 之ClustalW方法進行序列排序及相似性百分比演算。以MEGA 4.0版演化分析軟體，進行2008年分離株與41株分別屬於DHAV-1、DHAV-2及DHAV-3病毒之VP1核酸及氨基酸序列之親源關係分析 ( 表1 )。
6. 疫苗保護試驗：以本所研發之03D DHAV-1活毒減毒疫苗 (  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/劑量 )，肌肉注射1日齡雛鴨。免疫後7日，分別以 $10^{3.5}$  EID<sub>50</sub>之08D-8或08D-9強毒株行肌肉注射方式攻毒，攻毒後連續觀察8日，並記錄死亡隻數。
7. NDV病原性試驗：病毒經10倍稀釋後腦內接種( 0.1 mL ) 10隻1日齡無特定病原 ( SPF ) 小雞，持續觀察8天，記錄其健康情形，計算腦內接種病原指數 ( intracerebral pathogenicity index, ICPI )，以判定本次NDV分離株的病原性(15)。

## 結果

### 1. 病毒分離及病毒中和試驗：

自2008年送檢的21個病例中，總計分離出18株DHAV-1，其中3個病例同時分離出NDV。混合感染NDV及DHAV-1之雞胚胎尿囊液，經分別以NDV或DHAV-1高免血清中和後配合極限稀釋法進行DHAV-1或NDV純化，以進行後續試驗。18

株純化後之 DHAV-1 分離株均可以被 DHAV-1 5886 病毒株陽性血清完全中和。

## 2. RT-PCR及序列分析

18 株 DHAV-1 分離株經以 0720/1D 引子進行 DHAV-1 VP1 全長之 RT-PCR，均可增幅 840 bp 之特異性核酸產物（圖 1）。經以序列分析結果顯示所有 DHV 分離株均屬於 DHAV-1，2008 年與 2003 年分離株於 VP1 之核酸及氨基酸相似性達 99.2% 及 99.6%，與 5886 疫苗株相似性亦達 92.3% 及 95.4%，2008 年分離株彼此之核酸及氨基酸相似性達 99.3% 及 99.2%（表 2）。演化分析之結果顯示，無論以 VP1 全長之核酸或氨基酸序列進行均可將 DHAV-1、2 及 3 加以區分，重現性（bootstrap value）均達 99% 以上（圖 2, 3）。以核酸序列進行演化分析可將 DHAV-1 區分為 7 個基因型，台灣自 1971 年以後分離之 DHAV-1 均屬於同一 TW 基因型。以氨基酸序列進行演化分析，DHAV-1 區分為 6 個基因型，所有自 2003 年以後的台灣分離株亦均屬於同一 TW 基因型，但是 1971 年之 K411 株則與英國 H 疫苗株被獨立分類於第 IV 基因型。3 株 NDV 以 NDV F370 引子進行 RT-PCR，均增幅出 370 bp 之 F 基因特異性核酸產物，其融合蛋白切割位序列均為 RREKRF，呈現高病原性 NDV 於融合蛋白切割位序列具多個鹼性氨基酸之序列特徵。

## 3. 疫苗保護試驗

DHAV-1 疫苗免疫組所有鴨隻均可耐過 08D-8 及 08D-9 強毒株攻擊，未免疫對照組以 08D-8 及 08D-9 強毒株攻擊後鴨隻死亡率分別為 42.9% 及 69.2%（表 3）。

## 4. NDV 病原性試驗

08D-3 及 08D-11 病毒株之 ICPI 分別為 1.75 及 1.31，加上融合蛋白切割位序列具多個鹼性氨基酸之序列特徵，屬於 NDV 強毒株，08D-16 病毒株之 ICPI 僅為 0.175，屬於 NDV 弱毒株，。

量死亡之疫情，經由本所提供 DHAV-1 耐過鴨血清及疫苗後加以控制<sup>(1)</sup>。1989 年台灣再度爆發鴨肝炎疫情，經研究發現本次鴨肝炎疫情係因新血清型之 DHAV-2 與鴨源小病毒混合感染所致<sup>(5, 13)</sup>，經由本所提供水禽小病毒與鴨肝炎病毒雙價不活化疫苗，才將本次疫情予以控制，自此以後，未再爆發雞鴨感染鴨肝炎大量死亡之疫情。

2008 年 6 月開始，台灣中南部各縣市陸續爆發雞鴨大量死亡之疫情，病死鴨隻剖檢病變為典型 DHV 肝臟出血病變。18 株 DHV 分離株均可以被 DHAV-1 5886 陽性血清完全中和，NI 分別介於 5.33 ~ 7.67，均高於 OIE 規範之 2.0，故判定 18 株 DHV 均屬於 DHAV-1。

在 picornavirus 之 VP1 結構蛋白具有最重要的中和決定位，可誘發宿主最高之免疫力，也與病毒血清型別有關。因為免疫壓力等因素造成 VP1 序列無論於演化速率或序列差異性均較 picornavirus 其他區域明顯。近年來包括腸病毒等 picornavirus 均已採用 VP1 序列分析作為血清型別分類之依據，同一血清型病毒之 VP1 核酸及氨基酸序列相似性分別高於 75% 及 85%<sup>(8)</sup>。

2008 年分離株無論與 2003 年分離株或 5886 疫苗株之核酸及氨基酸序列相似性均高達 92.3% 以上，顯示 2008 年分離株為 DHAV-1，並非 DHAV-2 或 DHAV-3 入侵造成本次疫情。演化分析顯示自 2003 年以後台灣之 DHAV-1 分離株即屬於獨立的一群，本次 2008 年分離株亦分類於此 TW 基因型中，所以本次之疫情並非自中國、韓國或其他國家入侵，而是本土型 DHAV-1 再次爆發所致。疫苗保護試驗因為所使用之攻毒株病毒力價偏低，造成未免疫對照組攻毒後致死率僅為 42.9% 及 69.2%，並非 OIE 規範之致死率達 80% 以上，但免疫組鴨隻 100% 耐過攻毒之結果則顯示，DHAV-1 疫苗可以有效保護雞鴨耐過 2008 年 DHAV-1 強毒株攻擊。

既然不是新血清型 DHV 入侵，本所於 1983 年已將 DHAV-1 活毒減毒疫苗無償技術轉移台灣生物製劑有限公司，為何爆發本次疫情？2 株與 DHAV-1 混合感染之 NDV 強毒株，尤其 08D-3 病毒株之 ICPI 達 1.75，

## 討論

台灣於 1971 年首次爆發雞鴨感染 DHAV-1 大

是否影響DHAV-1病原性？

將NDV與08D-3病毒株同時混合感染1日齡雛鴨時，並未造成雛鴨死亡率之增加，此結果顯示NDV強毒並不會加強DHAV-1對雛鴨隻病原性（未發表資料）。故爆發本次DHV疫情，並非新血清型DHV或者DHAV-1變異株入侵，NDV強毒株與本次疫情亦無關聯。本次疫情可能因為種鴨場為避免種鴨因為注射DHAV-1活毒減毒疫苗引發緊迫造成產蛋下降，而改採以卵黃抗體被動免疫雛鴨進行鴨肝炎之防疫，但因卵黃抗體自2008年開始停產，以至於爆發本次疫情。所以種鴨未來應於產蛋期前完成DHAV-1活毒減毒疫苗免疫，藉由高力價移行抗體保護雛鴨耐過野外DHAV-1強毒感染，才是最具經濟效益之防疫模式。

## 參考文獻

1. 呂榮修、李永林、謝快樂、陳忠松、林再春、陳守仕。在台灣鴨病毒性肝炎耐過鴨血清緊急防治試驗。台灣省畜衛所研報。No. 9: 87-96, 1972.
2. Haider SA, Calnek BW, 1979. In vitro isolation, propagation and characterization of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis.* 23, 715-729.
3. Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Kim SJ, Tolf C, Kim JH, Sung HW, Lindberg AM, Kwon JH, 2007. 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.* 152, 2059-2072.
4. Levine PP, Fabricant J, 1950. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America. *Cornell Vet.* 40, 71-86.
5. Lu YS, Lin DF, Lee YL, Liao YK, Tsai HJ, 1993. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in duckling in Taiwan. *Exp. Rep. TPRIAH.* 29, 63-70.
6. McNulty MS, 2001. Picornaviridae. In: Jordan, F., Pattison, M., Alexander, D., Faragher, T. (Eds.), *Poultry Diseases*, fifth ed. W.B. Saunders, London, pp. 305-318.
7. OIE 2004. Duck virus hepatitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Part 2. Section 2.7. Chapter 2.7.9. <http://www.oie.int/eng/publicat/enstandards.htm>.
8. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA, 2002. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. *J. Virol.* 73, 1244-1251.
9. Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L, 1992. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis.* 36, 932-936.
10. Todd D, Smyth VJ, Ball NW, Donnelly BM, Wylie M, Knowles NJ, Adair BM, 2009. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathol.* 38, 21-30.
11. Toth TE, 1969. Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. *Avian Dis.* 13, 834-846.
12. Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ, 2007. Molecular analysis of type 1 duck hepatitis virus indicated that it should be assigned to a new genus. *Virus Res.* 123, 190-203.
13. Tseng CH, Tsai HJ, 2007. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus, *Virus Res.* 126, 19-31.
14. Wang L, Pan M, Fu Y, Zhang D, 2008. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes* 37, 352-359.
15. Woolcock PR, 2003. Duck hepatitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (Eds.), *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State Press, Ames, IA, pp. 343-354.

表 1. DHAV 病毒株基本資料

| 血清型    | 病毒株      | 來源    | 參考文獻                              |
|--------|----------|-------|-----------------------------------|
| DHAV-1 | K411     | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | 03D      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , 2007        |
|        | 04D      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | 05D      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | 06D      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | 08D-3~18 | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | Chiba    | Japan | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | Saitama  | Japan | Tseng <i>et al.</i> , unpublished |
|        | 5886     | 美國    | Tseng <i>et al.</i> , 2007        |
|        | R85952   | 美國    | Kim <i>et al.</i> , 2006          |
|        | DRL-62   | 美國    | Kim <i>et al.</i> , 2006          |
|        | H        | 英國    | Tseng <i>et al.</i> , 2007        |
|        | DHV-HS   | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | DHV-HSS  | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | C80      | 中國    | Ding and Zhang, 2007              |
|        | S        | 中國    | Feng <i>et al.</i> , unpublished  |
|        | R        | 中國    | Luo <i>et al.</i> , unpublished   |
|        | XZ       | 中國    | Wang <i>et al.</i> , unpublished  |
|        | A66      | 中國    | Zhang <i>et al.</i> , unpublished |
|        | JX       | 中國    | Zhang <i>et al.</i> , unpublished |
|        | E53      | 中國    | Zhang and Guo, unpublished        |
|        | HP-1     | 中國    | Zhang and Guo, unpublished        |
|        | AV2111   | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SH       | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY1      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY2      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY3      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY4      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY5      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | SY6      | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | ZI07-1   | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | ZI07-2   | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | ZJ       | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | ZJ-A     | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
|        | ZJ-A2    | 中國    | Liu <i>et al.</i> , 2008          |
| DHAV-2 | 90D      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , 2007        |
|        | 04G      | 台灣    | Tseng <i>et al.</i> , 2007        |
| DHAV-3 | AP03337  | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | AP04009  | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | AP04203  | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | AP04114  | 南韓    | Kim <i>et al.</i> , 2007          |
|        | FS       | 中國    | He <i>et al.</i> , unpublished    |

表 2. DHAV-1 分離株與疫苗株核酸及氨基酸序列相似性百分比

|           |     | % Identity        |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |      |
|-----------|-----|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
|           | 03D | 08D-3             | 08D-4 | 08D-5 | 08D-6 | 08D-8 | 08D-9 | 08D-10 | 08D-11 | 08D-13 | 08D-14 | 08D-15 | 08D-16 | 08D-18 | 5886 |
| (a) 核酸序列  |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |      |
| 03D       | ■   | 99.3 <sup>a</sup> | 99.3  | 99.3  | 99.4  | 99.3  | 99.2  | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.3   | 99.2   | 92.4 |
| 08D-3     |     | ■                 | 99.4  | 100   | 99.6  | 100   | 99.9  | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 100    | 99.9   | 100    | 92.4 |
| 08D-4     |     |                   | ■     | 99.4  | 99.6  | 99.4  | 99.3  | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.4   | 99.3   | 92.7 |
| 08D-5     |     |                   |       | ■     | 99.6  | 100   | 99.9  | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 100    | 99.9   | 92.4 |
| 08D-6     |     |                   |       |       | ■     | 99.6  | 99.4  | 99.7   | 99.7   | 99.7   | 99.7   | 99.7   | 99.6   | 99.4   | 92.6 |
| 08D-8     |     |                   |       |       |       | ■     | 99.9  | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 100    | 99.9   | 92.4 |
| 08D-9     |     |                   |       |       |       |       | ■     | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.4   | 99.9   | 99.7   | 92.3 |
| 08D-10    |     |                   |       |       |       |       |       | ■      | 99.7   | 99.7   | 100    | 100    | 99.6   | 99.4   | 99.6 |
| 08D-11    |     |                   |       |       |       |       |       |        | ■      | 99.7   | 99.7   | 99.7   | 99.6   | 99.4   | 99.6 |
| 08D-13    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        | ■      | 99.7   | 99.7   | 99.6   | 99.4   | 99.6 |
| 08D-14    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        | ■      | 99.7   | 99.7   | 99.6   | 99.6 |
| 08D-15    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        | ■      | 100    | 99.6   | 99.6 |
| 08D-16    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        | ■      | 99.6   | 99.4 |
| 08D-18    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        | ■      | 99.3 |
| 5886      |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        | ■    |
| (b) 氨基酸序列 |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        |      |
| 03D       | ■   | 100               | 99.6  | 100   | 99.6  | 100   | 99.6  | 100    | 99.6   | 99.6   | 100    | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-3     |     | ■                 | 99.6  | 100   | 99.6  | 100   | 99.6  | 100    | 99.6   | 99.6   | 100    | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-4     |     |                   | ■     | 99.6  | 99.2  | 99.6  | 99.2  | 99.6   | 99.2   | 99.2   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 95.4 |
| 08D-5     |     |                   |       | ■     | 99.6  | 100   | 99.6  | 100    | 99.6   | 99.6   | 100    | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-6     |     |                   |       |       | ■     | 99.6  | 99.2  | 99.6   | 99.2   | 99.2   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 95.8 |
| 08D-8     |     |                   |       |       |       | ■     | 99.6  | 100    | 99.6   | 99.6   | 100    | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-9     |     |                   |       |       |       |       | ■     | 99.6   | 99.2   | 99.2   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 95.4 |
| 08D-10    |     |                   |       |       |       |       |       | ■      | 99.6   | 99.6   | 100    | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-11    |     |                   |       |       |       |       |       |        | ■      | 99.2   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 95.4 |
| 08D-13    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        | ■      | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 99.6   | 95.4 |
| 08D-14    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        | ■      | 100    | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-15    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        | ■      | 100    | 100    | 95.8 |
| 08D-16    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        | ■      | 100    | 95.8 |
| 08D-18    |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        | ■      | 95.8 |
| 5886      |     |                   |       |       |       |       |       |        |        |        |        |        |        |        | ■    |

■: 100。

<sup>a</sup>: 以Clustal W pair-wise alignment演算。

表 3. 疫苗保護試驗結果

| 組別            | 攻毒株   | 攻毒後日數             |      |             |             |             |             |      |             | %<br>死亡率         |
|---------------|-------|-------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|------------------|
|               |       | 1                 | 2    | 3           | 4           | 5           | 6           | 7    | 8           |                  |
| 03D 疫苗<br>免疫組 | 08D-8 | 0/14 <sup>a</sup> | 0/14 | 0/14        | 0/14        | 0/14        | 0/14        | 0/14 | 0/14        | 0<br>( 0/14 )    |
|               | 08D-9 | 0/14              | 0/14 | 0/14        | 0/14        | 0/14        | 0/14        | 0/14 | 0/14        | 0<br>( 0/14 )    |
| 對照組           | 08D-8 | 0/14              | 0/14 | <b>1/14</b> | <b>3/14</b> | <b>1/14</b> | <b>1/14</b> | 0/14 | 0/14        | 42.9<br>( 6/14 ) |
|               | 08D-9 | 0/13              | 0/13 | <b>2/13</b> | <b>4/13</b> | <b>1/13</b> | <b>1/13</b> | 0/13 | <b>1/13</b> | 69.2<br>( 9/13 ) |

<sup>a</sup>: 死亡頭數/試驗頭數。

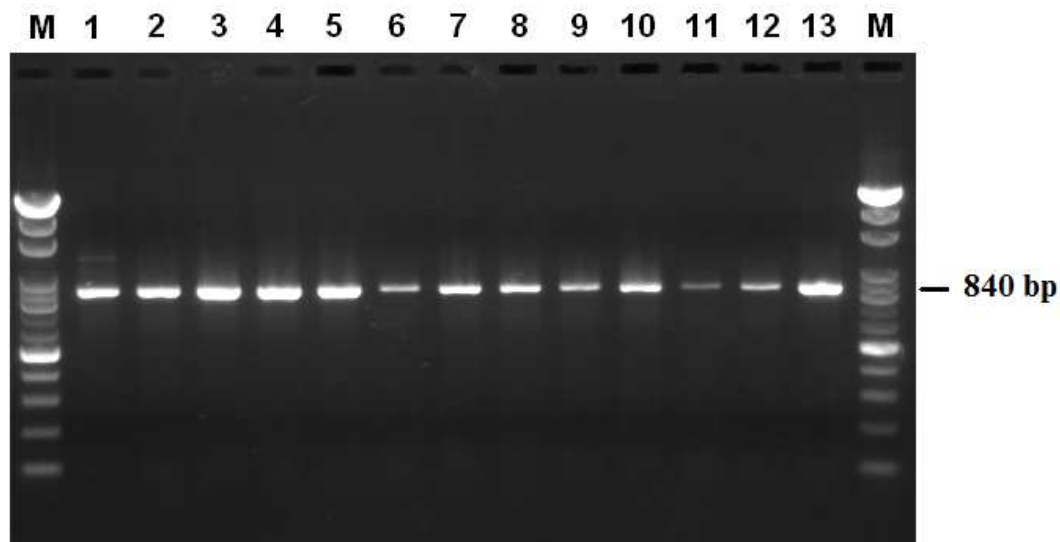


圖 1. 以 0720/1D 引子進行 2008 年 DHAV-1 病毒株 VP1 核酸增幅，均可增幅 840 bp 之特異性核酸產物。M：100 bp 梯度標記，1 至 13 分別為 08D-3 至 08D-18 等 13 株病毒株 VP1 核酸增幅產物。



圖 2. 以 DHV-I VP1 全長核酸序列經 ClustalW 排序後,以 MEGA 4.0 分析軟體之 Neighbor-joining 方法進行 2008 年台灣 DHV 分離株與其他 40 株 DHV 之親源關係分析。結果 DHV-I 可以區分為 DHAV-1、DHAV-2 及 DHAV-3,所有 DHAV-1 台灣分離株均屬 TW 基因型。線條代表基因差距。

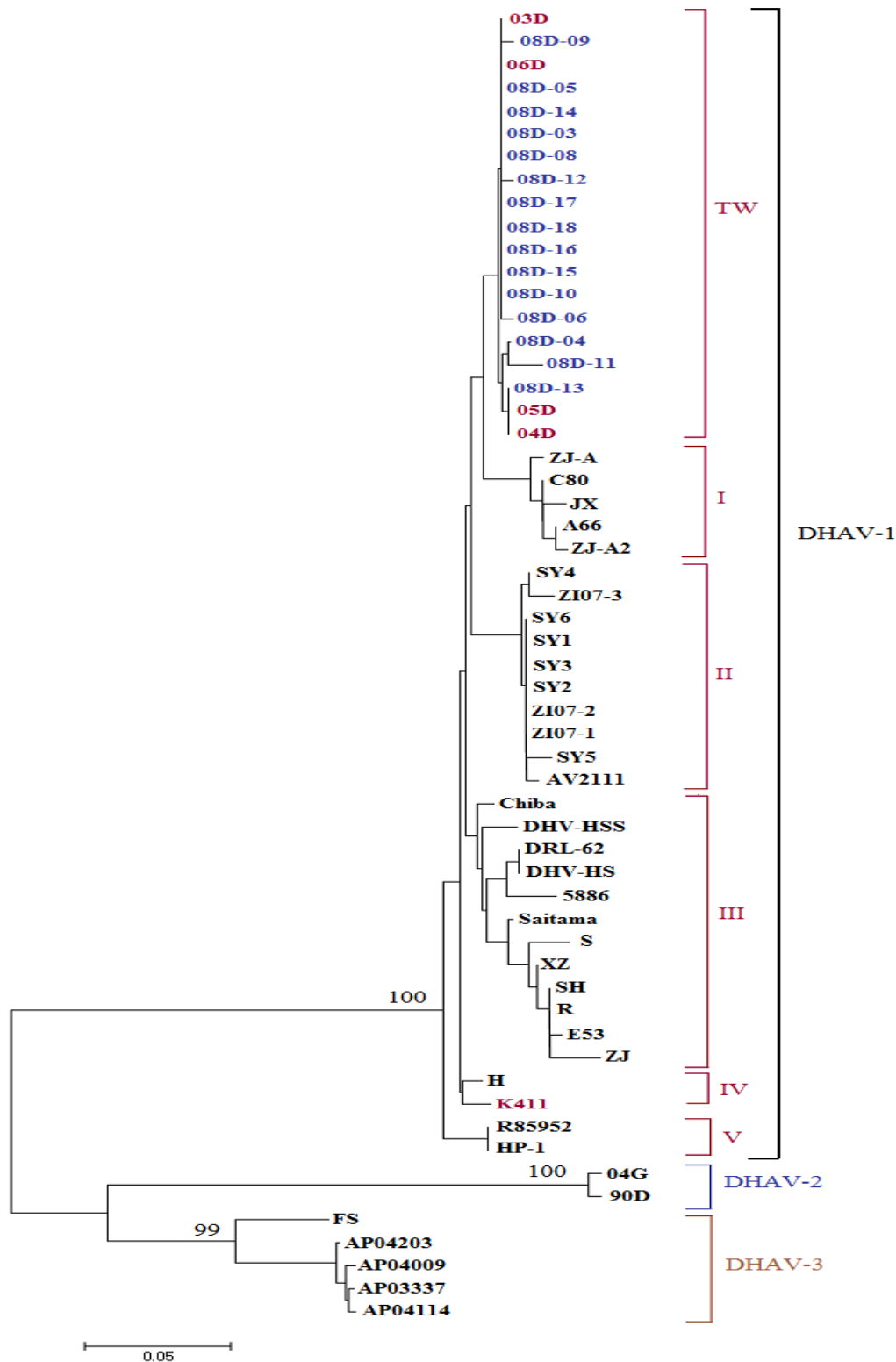


圖 3. 以 DHV-I VP1 全長氨基酸序列經 ClustalX 排序後，以 MEGA 4.0 分析軟體之 Neighbor-joining 方法進行親源關係分析。結果 DHV-I 可以區分為 DHAV-1、DHAV-2 及 DHAV-3，期中 DHAV-1 可以進一步再區分為 6 種基因型。台灣自 2003 年以後之 DHAV-1 分離株均屬於獨立的 TW 基因型。線條代表基因差距。

## Characterization and Sequence Analyses of Duck Hepatitis Viruses Isolated in 2008

C. H. Tseng\*, Y. H. Shih, P. W. Chen, L. Q. Jian, T. S. Huang, C. C. Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

**Abstract** Severe outbreaks of duckling and gosling hepatitis, caused by duck hepatitis virus occurring in Taiwan since June 2008 were studied; 21 strains were isolated from specimens. Among them, 18 samples were identified to be duck hepatitis A virus type I (DHAV-1) and 3 samples were identified to contain the Newcastle disease virus (NDV) after sequence analyses and serologic tests. Based on the virus sequence data, the virus causing the outbreaks was confirmed to be DHAV-1. Similarities of VP1 nucleic acids and amino acids of the 18 isolates were 99.2% and 99.6% compared with the DHAV-1 from 2003 and were 92.3% and 95.4% compared with the 5886 vaccine strain. All these DHV isolates could be neutralized by a standard serum against DHAV-1, and the neutralization indices were between 5.33 and 7.67, indicating that all these isolates belonged to DHAV-1 group. In addition, the one-day old ducklings vaccinated with DHAV-1 vaccine by intramuscular route all survived DHV/2008 challenge on the 7<sup>th</sup> day post vaccination. The protection rates of vaccinated groups of ducklings were 100%, but the mortalities for non-vaccinated control groups of ducklings were 42.9% and 69.2%, respectively. According to the results mentioned above, we suggest that the outbreaks are caused by the DHAV-1, but not by any mutants or other serotypes of DHV.

**Keywords:** *duck hepatitis virus, Newcastle disease virus, phylogenetic analysis*

---

\*Corresponding Author  
Animal Health Research Institute