

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-074

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：蔡向榮 執行機構及單位名稱：國立台灣大學獸醫學系

題目：鴨病毒性肝炎病毒核酸分析

Abstract

一、中文摘要

鴨病毒性肝炎 (Duck Viral Hepatitis ; DVH) 主要發生在幼鴨，為一高死亡率的病毒性疾病，並以肝炎為主要病變特徵。台灣曾分別於 1972 與 1990 年爆發兩次大流行。由於截至目前為止，全世界尚無鴨病毒性肝炎病毒核酸序列之發表，造成對本病毒之研究一直無法突破，在本計畫中利用 NCBI 之 Genebank 中小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 病毒株之核酸序列，將不同病毒屬之 *Picornavirus* 分別以 Clustal W^R 及 Dnastar^R 分析套組之 Megalign 程式以 cluster 方式進行核酸多條序列比對，依據比對之結果設計出多對針對不同 *Picornavirus* 病毒屬及不同核酸相對位置之 Degenerate Primer，再以設計出之多對 Degenerate Primer 行 RT-PCR，結果以 RT-PCR 增幅之產物經核酸定序後，一段 589 bp 之產物經以 Blastx 方式比對後發現與 *Picornavirus* 之 3D 氨基酸序列具有高度之相似性。以此段 589 bp 之核酸序列分別以 Dnastar^R 及 Phylip^R 分析套組進行演化樹之分析，結果與 Human Rhinovirus 及 Porcine Enterovirus 具有較近之演化關係。本段序列係屬鴨病毒性肝炎病毒之首段揭曉序列，經由本段序列之發現，將繼續對本病毒之基因體進行後續之研究，及發展以 RT-PCR 為主體之快速診斷方法，以解決目前耗時費日之舊有診斷方式。

關鍵詞：鴨病毒性肝炎、小 RNA 病毒科、核酸序列

Duck viral hepatitis (DVH) usually affects young ducklings and caused high mortality. The disease is characterized with typical hepatitis lesions. In Taiwan, two major outbreaks of DVH occurred in 1972 and 1990 respectively. Up to date, no nucleotide sequence of DVH virus has been revealed. So the study on the virus are rare. In this project, we retrieved the viral nucleotide sequence of the Picornaviridae family from Genebank of NCBI. Then we used the cluster method of Megalign program in Clustal W^R and Dnastar^R package to conduct the multiple sequence comparison. Based on the results of the comparison, degenerate primers were designed according to the different virus genus in the Picornaviridae and targeting to the different location. After conducting RT-PCR, one set of the primer could generate a 589bp products. The RT-PCR product was sequenced and phylogenetic analyzed by Dnastar^R及 Phylip^R programs. The results indicated that DVH virus is more related to the human rhinovirus and porcine enterovirus.

Keywords: Duck Viral Hepatitis, *Picornaviridae*, Nucleotide Sequences

二、緣由與目的

鴨病毒性肝炎 (Duck Viral Hepatitis; DVH) 主要發生在幼鴨，為一高死亡率、快速傳播的病毒性疾病，並以肝炎為主要病變特徵 (1, 2, 26)。本病於 1948 年首先在美國紐約長島由 Leviene 及 Fabricant 報告 (26)，台灣曾分別於 1972 與 1990 年爆發兩次大流行 (3, 4, 17, 18)。DVH 病毒可分成三型，分別命名 DVH 第 1、2、及 3 型。第 2、3 型是從免疫過第 1 型鴨病毒性肝炎疫苗的鴨仍發生肝炎所發現，但發病率及死亡率均較低 (1, 2, 23, 24, 26)。目前第 2 型只發生於英國、而第 3 型只於美國有發生之報告 (23)。鴨病毒性肝炎第 1 型病毒之分類為 *Picornaviridae* 中的 *enterovirus*，目前已發現具有血清學上相異的變異株 (variant) 產生 (24)。第 2 型之病原為 *astrovirus*，第 3 型的病原則同第 1 型為 *Picornavirus* 但彼此間抗原性並無相關 (2, 23, 26)。DVH 第 1 型的發病率可達 100%，而死亡率則依年齡不同而異，小於 1 週齡之小鴨其死亡率可達 95%，隨著年齡愈高發病率與死亡率則愈低 (2, 26)。病鴨常在症狀發生後一小時內死亡。死後剖檢，病變主要在肝臟，以肝細胞的壞死為主 (1, 2, 10, 11, 26)。

由於截至目前為止，並無鴨病毒性肝炎病毒核酸序列之發表，造成對本病毒之研究一直無法突破，本計畫預計將鴨病毒性肝炎台灣分離株之基因體部分核酸序列加以定序，以供後續試驗之進行。

二、結果與討論

目前已利用本實驗室設計之多對針對不同 *Picornavirus* 病毒屬及不同核酸相對位置之 Degenerate Primer 進行 RT-PCR，結果一段 589 bp 之產物經以 Blastx 方式比對後發現與 *Picornavirus* 之 3D 氨基酸序列具有高度之相似性。以此段 589 bp 之核酸序列中之 468 bp 之序列與不同

Picornavirus 病毒屬病毒之 3D 序列進行核酸及氨基酸序列之比對，結果發現本段核酸序列與其他 *Picornavirus* 病毒屬病毒之 3D 核酸序列可高達 55.1% 之一致性，將本段核酸序列轉換成氨基酸序列後其與不同 *Picornaviridae* 病毒屬病毒之 3D 氨基酸序列更可高達 57.9% 之一致性。本段序列係屬鴨病毒性肝炎病毒之首段序列，經由本段序列之發現，將繼續對本病毒之基因體進行後續之研究，及發展以 RT-PCR 為主體之快速診斷方法，以解決目前耗時費日之舊有診斷方式。

四、計畫成果自評

執行本計畫第一年，已將鴨病毒性肝炎病毒之基因體 3D 部分序列予以定序完成，此為目前已知之鴨病毒性肝炎病毒之首段核酸序列。藉由此段核酸序列之資料，可繼續發展本病之反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 及核酸探針雜交等的快速診斷方法之建立，以解決目前對鴨病毒性肝炎病毒分離之耗時費力的困擾。

五、參考文獻

1. 宋華聰、林茂勇。1995。禽病檢查手冊。台北。藝軒。303-314。
2. 呂榮修。1995。禽病診斷彩色圖譜。台北，中華民國養雞協會。55-64。
3. 呂榮修、李永林、林再春、黃士則、邱朝齊、楊揚輝。1974。鴨病毒性肝炎活毒疫苗之研究。台灣省畜衛試研報。11：123-130。
4. 呂榮修、李永林、謝快樂、陳忠松、林再春、陳守仕。1972。在台灣鴨病毒性肝炎耐過鴨血清緊急防治試驗。台灣省畜衛試研報。9：87-96。

5. Ahmed AA, El-Abdin TZ, Hamza S. 1975. Effect of experimental duck virus hepatitis infection on some biochemical constituents and enzymes in the serum of white Peking ducklings. *Avian Dis* 19: 305-310.
6. Davis D. 1987. Duck hepatitis virus: adaptation of a plaque assay to determine 50 per cent end points with duck sera. *Res Vet Sci* 42: 167-169.
7. Davis D, Woolcock PR. 1986. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species. *Res Vet Sci* 41: 133-134.
8. Ernest SK. 1990. Amplification of RNA. In: Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky, Tomas J. White, ed. *PCR Protocols*. London, Academic Press. p.p.21-27.
9. Fitzgerald JE, Hanson LE. 1996. Certain properties of a cell-culture-modified duck hepatitis virus. *Avian Dis* 10: 157-161.
10. Fitzgerald JE, Hanson LE, Simon J. 1969. Histopathologic changes induced with duck hepatitis virus in the developing chicken embryo. *Avian Dis* 13: 147-157.
11. Friend M, Trainer DO. 1972. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. *Avian Dis* 16: 692-699.
12. Gough RE, Wallis AS. 1986. Duck hepatitis type I and influenza in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Vet Rec* 24: 602.
13. Gow JW, McGill MM, Behan PO. 1996. Long RT-PCR amplification of full-length enterovirus genome. *Biotechniques* 20: 582-582.
14. Hwang J. 1969. Duck hepatitis virus-neutralization test in chicken embryos. *Am J Vet Res* 30: 861-864.
15. Hwang J. 1975. Thermostability of duck hepatitis virus. *Am J Vet Res* 36: 1683-1684.
16. Jonassen Tø, Elisabeth K, Bjørn G. 1993. Detection of human astrovirus serotype1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 44: 83-88.
17. Leister D, Thompson R. 1996. Production of full-length cDNA from a picornaviral genome by RT-PCR. *Trends in Genetics* 12: 11.
18. 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 ducklings in Taiwan. *Avian Dis* 37: 591-596.
19. Lu YS. 1983. Epidemiological studies on duck viral hepatitis. *Jour Chinese Soc Vet Sic* 9:11-18.
20. Mason RA, Tauraso NM, Ginn RK. 1972. Growth of duck hepatitis virus in chicken embryos and in cell culture derived from infected embryos. *Avian Dis* 16: 973-979.
21. Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W. 1990. Detection and differentiation of picornaviruses in

- clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 71: 2141-2147.
22. Quiros E, Piedrola G, Maroto MC. 1997. Detection of enteroviral RNA by a new single-step PCR. *Scand J Clin Lab Invest* 57: 415-420.
23. Sajjad AH, Bruce WC. 1979. In vitro isolation, propagation, and characterization of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis* 23: 715-729.
24. Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. 1992. Pathologic and serologic characterization of variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis* 36: 932-936.
25. Tauraso NM, Coghill GE, Klutch MJ. 1969. Properties of the attenuated vaccine strain of duck hepatitis virus. *Avian Dis* 13: 321-329.
26. Woolcock PR, Fabricant J. Duck virus hepatitis. 1991. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, ed. *Disease of Poultry IX*. Iowa, Iowa State University Press, p.p.597-608.
27. Woolcock PR, Creighton GW. 1979. Duck virus hepatitis: serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet Rec* 105: 715-729.
28. Zhao XL, Phillips RM, Li GD, Zhong AQ. 1991. Studies on detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 35: 778-782.