

新城疫病毒的进化及其新型疫苗的研制

刘秀梵, 胡顺林

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点实验室, 江苏扬州 225009)

[收稿日期] 2009 - 12 - 27 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2010) 01 - 0012 - 07 [中图分类号] S852.659.5

[摘要] 新城疫病毒 (NDV) 虽然只有一个血清型, 但其强毒已进化出现了九个基因型。近年来, ND 疫苗在世界范围内得到了广泛使用, 但免疫鸡群中 ND 强毒感染仍然常见。常用疫苗株 La Sota 对不同基因型的 ND 强毒流行株虽能产生完全的临床保护, 但并不能防止流行株在免疫鸡中的感染复制和排出。国内外研究结果显示: 当疫苗株与流行株的基因型一致时, 其不仅能提供理想的临床保护, 而且能显著降低免疫鸡的强毒感染率和排毒量, 在临床上可有效控制免疫鸡群中非典型 ND 的发生。当前我国 NDV 的优势流行株属基因 V II 型, 因此该型 ND 疫苗在控制我国 ND 的流行中将具有非常广阔的应用前景。

[关键词] 新城疫病毒; 疫苗; 流行株; 基因 V II 型

Evolution of Newcastle Disease Virus and the Development of Novel Vaccines

LU Xiu - fan, HU Shun - lin

(Key Laboratory of animal infectious diseases, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; China)

Abstract: Virulent Newcastle disease viruses (NDV) have evolved into nine genotypes although they belong to one serotype. In recent years, vaccination has been used extensively in the world for the prevention and control of ND, however, virulent NDV infection in vaccinated birds still occurred frequently. The commonly used vaccine strain La Sota can provide complete clinical protection against the prevalent strains of different genotypes, but can not prevent their infection, replication and shedding. Recent studies showed that the vaccine strain sharing the same genotype with the prevalent NDV not only provided ideal clinical protection but also effectively reduced the infection rate and shedding of the prevalent strain. Presently, the dominant prevalent NDV strains in China belong to genotype V II. Therefore this genotype - based vaccine will be a promising vaccine candidate for the control of current ND epidemic in China.

Key words: Newcastle disease virus; vaccine; prevalent strain; genotype V II

新城疫 (Newcastle Disease, ND) 自 1926 年被确认以来, 在世界范围内广为传播已有 80 多年, 它给养禽业带来了巨大的经济损失, 迄今仍是禽类最重要的疾病之一。新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus, NDV) 自 1946 年在我国首次分离至今已在

中国存在了 60 多年。近三十年来, 由于疫苗的广泛使用, ND 的发病率和死亡率均得到了较好的控制。但自二十世纪 90 年代以来, 临床上非典型 ND 的发生现象十分普遍, 同时, 临床上 NDV 与其它呼吸道病原体协同致病现象也较为常见, 因此, ND

作者简介: 刘秀梵 (1941 年 -), 中国工程院院士、教授、博士生导师, 研究方向为动物疫病防控。

仍然是当前困扰广大养殖户的重要疾病之一。另一方面,自上世纪 90 年代中期以来,在鹅群中也常见 ND 的爆发与流行^[1-2],此外,近年来也偶见一些鸭群发生 ND^[3-4],说明 ND 的易感宿主范围在进一步扩大。NDV 一直处于不断的进化之中,目前已产生了多个不同的基因型,由近十多年来的 ND 流行特点可知,从不同种类宿主临床病例中所分离到的 NDV 毒株绝大多数属于基因 V II 型^[1, 5],而常用 ND 疫苗株 La Sota 的基因型为 I 型,虽然它们同属一个血清型,但在遗传距离上流行株与常用疫苗株相差较远。因此,国内外多位学者研究认为:常规疫苗对当前 NDV 强毒株的攻击并不能提供理想的免疫保护效力,有必要研制新型的替代疫苗或者进一步改善疫苗当前的生产工艺^[6-7],以应对 ND 流行的新情况。

1 新城疫病毒基因组及其遗传进化

NDV 的基因组为不分节段、单股负链 RNA。病毒基因组结构模式为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码 6 种结构蛋白:核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, NP)、磷蛋白(Phosphoprotein, P)、基质蛋白(Matrix protein, M)、融合蛋白(Fusion protein, F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(Hemagglutinin-Neuraminidase protein, HN)和大分子蛋白(Large protein, L)^[8],其中 F 和 HN 蛋白是 NDV 表面重要的两个囊膜糖蛋白,它们在病毒的免疫中扮演了重要的角色。

NDV 基因组全长有 15 186、15 192 和 15 198 个核苷酸三种形式^[9-11]。其中前两种基因长度的 NDV 属于 Class II;最后一种基因组长度的新城疫病毒属于 Class I^[12-13],主要分布于野生和家养水禽中,而当前所用疫苗株和引起历史上 ND 四次大流行的毒株均属于 Class II。根据病毒 F 基因的序列,目前 Class II 中的 NDV 可被分为 I-X 9 个基因型(图 1)^[11],其中基因 I-M 型病毒的基因组长度为 15 186 个核苷酸,主要分离于 20 世纪 60 年代之前;而 60 年代后的分离株,主要为基因 V-V II 型,其基因长度为 15 192 个核苷酸^[9]。根据毒株的致病力试验结果:基因 I 型毒株均为弱毒株;在基因 II 型病毒中,除弱毒株外,还有中等毒力毒株和高致病力的强毒株;而在基因 I 和 II 型毒株之后出现的其它 7 个基因型(III-X 型)NDV 均为强毒。分子流行病学数据显示:基因 II 型、II 型和 IV 型毒株是引起 ND 世界第一次大流行(1920 年 -

1960 年)的 3 个主要基因型;基因 V 型和 V I 型(V Ia 和 V Ic 亚型)毒株的出现与 ND 的第二次大流行(1960 年 - 1970 年)密切相关;而七、八十年代的第三次 ND 大流行主要由来源于鸽的 V Ib 亚型毒株所引发;值得注意的是,自上世纪 90 年代以来,世界上多个国家一直处于由基因 V IId 亚型毒株所引起的第四次 ND 大流行之中。由上可知,从 1920 年 ND 首次被发现以来,NDV 已先后出现了 9 个基因型,此外,在 V 型和 V II 型当中还出现了多个基因亚型,表明 NDV 一直处在不断的进化之中,但是,目前我国禽群中普遍使用的弱毒疫苗株 La Sota 属于基因 I 型,其于 1946 年分离自美国,距今已有 60 多年的历史。

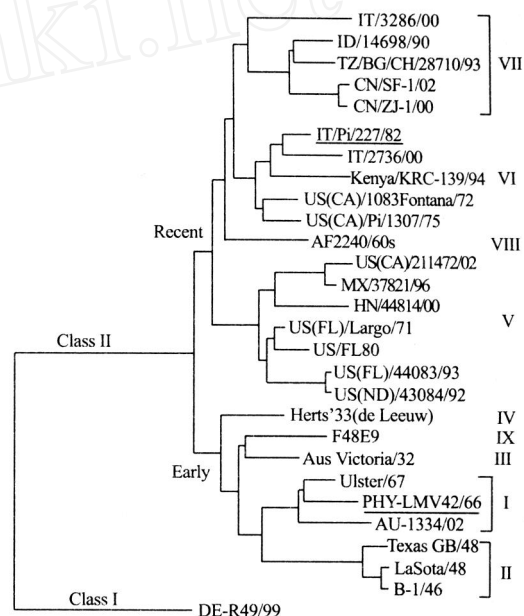


图 1 新城疫病毒基因组遗传进化示意图

(自 Czegledi, 2006)

2 近二十年来我国 ND 的流行状况

自上世纪八十年代以来,我国养禽业的数量和规模都有了明显的增加,但是生物安全措施并没有得到有效的实施,致使 ND 等传染病在中国大面积发生并迅速蔓延,给我国的养禽业造成了严重的经济损失。国内外同期的流行病学资料和数据表明:当时在我国鸡群中主要流行的 NDV 毒株为 V If 和 V Ig 亚型^[1, 14]。进入 90 年代,随着我国基层兽医工作者业务能力的提高,ND 疾病的预防工作得到了重视,ND 疫苗在我国得到了普遍使用,疫苗的使用在一定程度上控制了 ND 的发生,但是疫苗并不能完全保护免疫鸡群免受流行株的感染,致使临床上

出现了大量非典型 ND 的病例。上世纪 90 年代中期我国出现了 NDV 基因 V II 型, 并且成为我国 ND 流行的优势基因型, 当时占主导地位的流行毒株主要属于 V IIa 亚型。在免疫选择压和宿主适应力的双重作用下, NDV 在之后短短的时间内又出现了基因 V IIc 和 V IId 两个亚型^[11]。90 年代初、中期在我国华东地区曾出现了基因 V Ig 型和 V II 型同时并存的过渡期^[11], 但自 90 年代后期以来 V IId 亚型已成为我国流行的优势基因亚型^[1, 5, 15 - 16]。

自 1926 年从印尼爪哇发现 ND 以来, 在全世界范围内已经发生了四次 ND 大流行, 经过世界范围内几次大流行后, 其宿主范围已经明显扩大, 迄今能自然或人工感染的禽类已超过 250 多种。过去, 一般认为水禽对 NDV 有较强的抵抗力, 感染后不容易发病和造成流行或爆发。然而, 从 1997 年开始, 我国大面积出现了鹅群感染 NDV 并严重发病死亡的事件^[12], 水禽中 NDV 的感染给我国养禽业造成了严重的威胁和损失, 研究结果显示, 绝大多数发病水禽中分离到的 NDV 属于基因 V IId 亚型^[1 - 2]。

流行病学数据充分证明, 当前 V IId 亚型在我国流行强毒株中已占有绝对优势。扬州大学农业部畜禽传染病学重点实验室于 2005 至 2006 年间所分离的 20 个 NDV 强毒株中有 18 个属基因 V IId 亚型, 其它 2 株为基因 III 型^[17], 而 2007 至 2008 年所分离的 40 多个 NDV 强毒株全部属于基因 V IId 亚型。另外, 中国动物流行病研究中心提供的数据显示: 2005 至 2006 年间该中心所收集的 145 个强毒分离株中有 141 个属于基因 V IId 亚型, 还有 3 个为 III 型毒株^[15 - 16]。基因 III 型在我国很多发病禽群中都可以被分离到, 但总体分离率一般较低, 由于在我国普遍使用的 I 系苗属于基因 III 型, 因此推测当前临床上分离到的 III 型毒株可能与 I 系苗病毒突变后毒力增强所引起的临床发病有关^[18]。

3 疫苗株与流行株抗原差异性分析

虽然 NDV 血清型只有 1 个, 但是其基因型却有多, 表明 NDV 的基因组在选择压下正处在持续的进化之中, 交叉中和试验结果表明不同基因型毒株间的抗原性存在一定的差异。在交叉中和试验中为了解病毒之间的抗原性差异, 可根据抗原相关性公式 $R = r_1 \cdot r_2$, 计算抗原相关性值 R, 其中, $r_1 = B$ 病毒血清对 A 病毒的中和抑制滴度 $\div A$ 病

毒血清对 A 病毒的中和抑制滴度; $r_2 = A$ 病毒血清对 B 病毒中和抑制滴度 $\div B$ 病毒血清对 B 病毒的中和抑制滴度。根据文献 [19] 报道, R 值小于 0.7 时表明两病毒之间存在抗原性差异。台湾学者 Lin 等对基因 I 型疫苗株与流行株之间进行了交叉中和试验, 数据显示: 流行毒株与 B1 和克隆 30 株之间的抗原性差异值 (R) 主要在 0.15 至 0.5 之间, 从而证明流行株与疫苗株之间存在明显的抗原差异^[19]。李志杰等以同样方法在研究 F48E9 和鹅源分离株 NA - 1 之间的抗原差异时, 发现两毒之间的抗原性差异值为 0.5, 同样表明不同基因型两毒株的抗原性存在差异^[20]。目前普遍认为: 新城疫疫苗株与当前流行株之间的基因型和抗原性差异是引起免疫鸡群中感染强毒的主要原因^[21 - 23]。

HN 蛋白是 NDV 囊膜上最大的纤突糖蛋白, 具有识别靶细胞上的唾液酸受体, 介导病毒对靶细胞的吸附, 并促使新生的病毒子从感染细胞膜表面释放的功能, 在免疫反应中扮演着重要的角色。HN 蛋白有跨膜区、茎部和球状区三个部分组成, 其中球状区分布了所有单克隆抗体所识别的抗原位点、受体结合位点和神经氨酸酶活性位点^[24]。作为重要的保护性抗原蛋白, HN 蛋白始终被研究者们所重视。Iorio 等已证明在 HN 蛋白上存在 5 个最强的抗原区, 分别为 193 - 201 位、345 - 353 位、513 - 521 位、494 位及 569 位氨基酸区域^[25], 这与抗原表位分析软件预测结果基本符合, 研究结果显示: 这些区域或其邻近氨基酸序列的变化都会导致毒株与单抗的反应性发生根本性的改变^[25 - 26]。随机选取近年来我室分离的部分毒株 (均为 V IId 亚型), 就这些区域氨基酸的序列与常规基因 I 和 II 型疫苗株进行比对后发现: 流行株 HN 蛋白在这些区域或邻近的氨基酸与疫苗株存在明显的不同, 如图 2 所示: 疫苗株在 203、342、494 - 495、508 - 509、514 及 570 位的氨基酸分别为酪氨酸 (Y)、天冬氨酸 (D)、甘氨酸 (G) 和缬氨酸 (V)、丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T)、异亮氨酸 (I) 及甘氨酸, 而基因 V II 型分离株相应的位置则分别为组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、天冬氨酸和谷氨酸 (E)、天冬酰胺和异亮氨酸、缬氨酸及精氨酸 (R)。其中除 2 个氨基酸为保守性替换外, 其它氨基酸的改变都分别涉及到极性、结构及所带电荷的变化, 这些不同位点在疫苗株与流行株之间同时存在, 表明它们之间在一定程度上会存在抗原性的差异。

14 Sequences	200	340	350	490	510	570
HBV4	GCRDHSYSHQY KRYNDTC	PDEQDYQ GTMLDGV	QA F	STSRSRIT	VEILKDDGV	
Lasota	GCRDHSYSHQY KRYNDTC	PDEQDYQ GTMLDGV	QA F	STSRSRIT	VEILKDDGV	
JS-1-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
JS-2-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DKQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
JS-3-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DEQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
JS-4-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DEQDYQ GTILDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
JS-5-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DEQDYQ GTILDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
JS-6-05-	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DKQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
GX-1-05-	GCRDHSYSHQY KRYNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
GX-2-05-	GCRDHSYSHQY KRYNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
GX-3-05-	GCRDHSYSHQY KRYNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
AF456429	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
AF456430	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DGQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	
AF456431	GCRDHSYSHQY KRHNNTCP	DEQDYQ GTMLDDE	QA F	DNISRSRV	VEILKDDRV	

图2 流行株与疫苗株 HN蛋白抗原区氨基酸序列分析

4 常用疫苗株对流行株的保护效力试验和新疫苗的研制

由于 NDV 只有一个血清型,因此,过去多数学者认为不同基因型新城疫病毒之间具有较好的免疫交叉保护。进入上世纪 90 年代以来,ND 疫苗株在我国得到了大规模、高剂量的频繁使用,但是,即使在带有高滴度 NDV 抗体的免疫禽群中,ND 仍然时有发生,这在一定程度上表明,疫苗株在抵抗流行株的感染中,仍存在一些不足,这种现象引起了研究者的高度关注。为此,近 5 年来,国内外有多位学者对疫苗株抵抗流行株感染的能力又进行了重新验证和评价。

2005 年 Kapczynski 等^[6]用基因 II 型 NDV B1 株作为疫苗,分别免疫 2 周龄和 8 周龄的 SPF 鸡,免疫 2 周后以基因 V 型分离株进行攻毒试验,研究结果表明:虽然免疫鸡攻毒后没有发生死亡,但是不能抵抗 NDV 强毒的感染,免疫鸡在攻毒后仍能排毒。最近 Ezema 等^[27]研究发现 La Sota 虽然在严重发病和死亡指标上能够提供保护,但其免疫鸡的组织器官在强毒感染下仍然会产生较严重的病变,NDV 流行株感染后对免疫器官特别是法氏囊会造成明显的损伤(图 3),进而可能会诱发免疫抑制现象的产生。

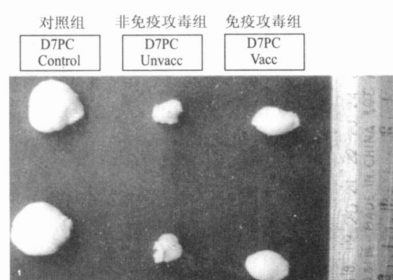


图3 攻毒后第7天免疫组与对照组试验鸡的法氏囊形态比较(自 Ezema, 2008)

2007 年,美国农业部东南禽病研究所 Miller 等^[28]以不同基因型 NDV 毒株制成疫苗,分别免疫 4 周龄 SPF 鸡 3 周后,再以北美基因 V 型流行株 CA02 进行攻毒,试验结果显示,当疫苗株与攻毒株为同一基因型时,疫苗株能有效减少鸡体内病毒的携带量,其免疫组鸡的喉气管和泄殖腔的病毒含量仅为基因 I 型疫苗株 B1 免疫组的 1/10,表明疫苗株与流行毒株的遗传距离相近时,其诱导的免疫保护效果较为理想。2009 年该研究组以反向遗传技术获得了表达基因 V 型毒株 F 和 HN 基因的重组 NDV (rA - CAFHN),该重组弱毒株与 La Sota 分别免疫试验鸡后,再以 II 型和 V 型强毒株对各免疫组进行攻毒,结果发现 II 型强毒 TXGB 感染后,La Sota 免疫组鸡的排毒率和排毒量均显著低于 rA - CAFHN 免疫组;相反 rA - CAFHN 免疫组鸡对 V 型强毒的保护能力明显强于 La Sota 免疫组,进一步证明:疫苗株与流行株高度同源时,其诱导的免疫保护效力最强^[29]。

在遗传发生树上,基因 II 型与 V II 型毒株遗传距离最远,II 型与 V II 毒株基因组的同源性仅有 82%,因此,II 型疫苗株在预防 V II 型强毒感染中存在的不足会更加明显。2008 年,韩国学者 Jeon 用 La Sota 制成的灭活苗免疫 SPF 鸡 3 周后再以基因 V II 型流行株 Kr - 005/00 攻毒,同时以非免疫攻毒组作为对照,结果发现,攻毒后第 3 天 La Sota 免疫组鸡喉气管中的排毒量与攻毒对照组相当;另外,攻毒后第 5 天该免疫组鸡在喉气管和泄殖腔中的病毒量仍然维持在一个较高的水平^[30]。

因此,以上研究结论一致认为常规疫苗在防制

当前 NDV 感染中,还存在明显的不足,应当进一步改善疫苗当前生产工艺或研制新型的替代疫苗。

基于上述原因,新城疫病毒新型疫苗的研制已成为当前禽类疫苗的研究热点,近年来 NDV 反向遗传技术的发展给新型疫苗的研制带来了又一次新的革命^[31]。2008年 Cho等^[32]以 La Sota基因组作为骨架,将流行株 KBNP - 4152 的 F 和 HN 基因替换 La Sota基因组上的相应部分,并对基因组进行了一系列的致弱突变,进而成功获得重组了基因 V II型 F 和 HN 基因的致弱毒株 KBNP - C4152R2L。重组病毒在体内连续传代后所产生的子代病毒均能保持稳定的生物学特性,每代病毒的鸡胚最小致死剂量平均死亡时间 (MDT) 均超过 100 h。以该重组病毒和 La Sota 制成灭活疫苗后分别免疫 115 日龄蛋鸡,免疫 3 周后再以另一基因 V II型流行毒株 SNU5074 攻毒,试验结果显示:攻毒后第 2 周和第 4 周,重组病毒

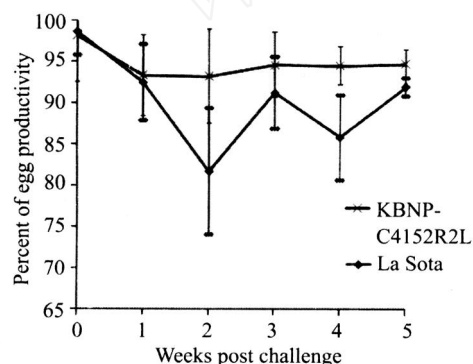
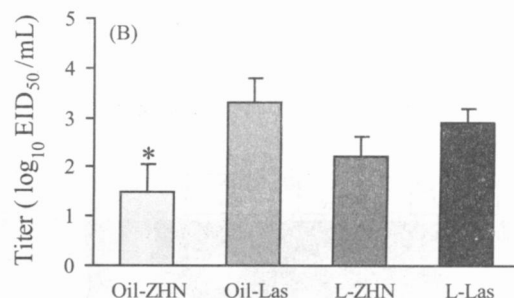
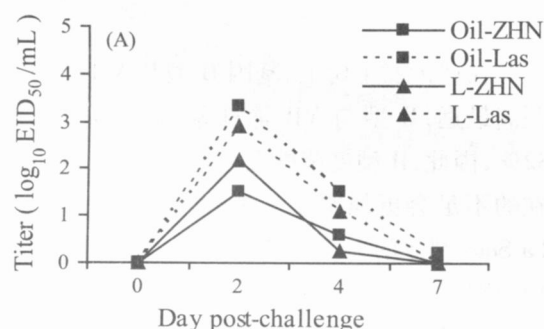


图 4 攻毒后不同免疫组鸡群的产蛋率比较 (自 Cho, 2008)

疫苗免疫组试验鸡的产蛋率分别为 93.2% 和

94.3%, 而 La Sota 免疫组鸡的产蛋率仅为 81.7% 和 87.3%, 与含 V II型 F 和 HN 基因的重组病毒免疫组相比下降了近 10 个百分点 (见图 4)。

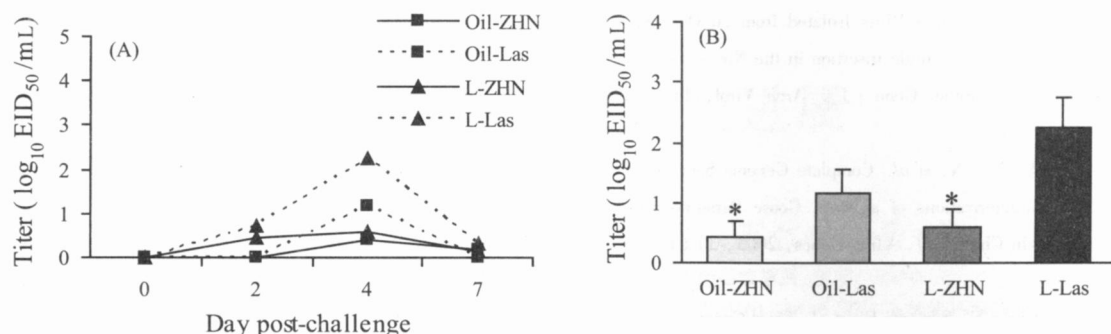
扬州大学农业部畜禽传染病学重点实验室研究人员利用反向遗传技术,成功拯救出了基因 V II型毒株 ZI1, 在实施致弱突变和基因修饰后, 获得了首个基因 V II型 NDV 致弱株 NDV / ZI1HN, 其 MDT 大于 120 h 且 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数 (ICPI) 仅为 0.16, 表明拯救病毒的毒力完全符合弱毒株的标准; 另外, 细胞感染试验结果显示, 突变毒株在成纤维细胞上不能产生细胞病变, 进一步证明: 突变株 NDV / ZI1HN 毒力已完全减弱。此外, 该致弱株在鸡胚上具有较佳的繁殖性能, 其尿囊液的血凝价和鸡胚半数感染量 (ED_{50}) 可分别达到 $9 \sim 10 \log$ 和 $10^{9.0} / 0.1 \text{ mL}$ 。致弱病毒的毒力返祖一直成为诸多科研工作者所担心的问题, 为了防止致弱后病毒毒力的返强, 我室对拯救毒株 F 裂解位点的多个氨基酸同时实施了突变, 大大降低了回复突变的概率。致弱株 NDV / ZI1HN 在鸡胚上连续传代 15 次后, 每代病毒的 MDT 均在 120 h 左右, 其毒力相当稳定。该致弱株与 La Sota 分别以活苗和灭活苗免疫试验鸡 4 周后, 再以基因 V II型 NDV 强毒株 JS2/06 (MDT = 45.6 h, ICPI = 1.90) 攻毒, 试验数据显示: 与常规疫苗株 La Sota 相比, 致弱株不仅能有效降低攻毒后试验动物的排毒率, 而且能显著减少喉气管和泄殖腔中的病毒含量, La Sota 免疫组在排毒高峰时的病毒量为基因 V II型弱毒株免疫组的 10 倍以上^[33] (图 5、图 6)。



(A) 攻毒后第 2、4、7 天喉气管棉拭样品中的病毒量; (B) 攻毒后第 2 天喉气管棉拭样品中的病毒量

*表示与 Oil-Las 组相比差异显著

图 5 攻毒后免疫鸡喉气管的排毒量 (自 Hu, 2009)



(A) 攻毒后第 2、4、7 天泄殖腔棉拭样品中的病毒量; (B) 攻毒后第 2 天泄殖腔棉拭样品中的病毒量

*表示同 L - Las 组相比差异显著

图 6 攻毒后免疫鸡泄殖腔的排毒量 (自 Hu, 2009)

致弱毒株 NDV / ZJ1HN 的亲本毒株为基因 V II_d 亚型, 与流行毒株的基因型完全一致。动物试验结果显示, 致弱毒株免疫动物后, 其免疫效果明显优于基因 II 型疫苗株 La Sota 免疫组, 因此, 该 V II_d 致弱株在控制当前新城疫的发生和流行方面具有较大的优势和潜力。

5 结 语

近三十年来, 虽然全世界都广泛使用疫苗来防控 ND, 但是免疫禽群中仍频繁出现 ND 强毒感染现象, 这引起了从业者的高度重视。近年来, 国内外多个实验室的研究结果表明, 由于 NDV 只有一个血清型, 常用的疫苗株能对不同基因型的流行株攻击提供较好的临床保护 (不发生症状和死亡), 但鸡群中流行株的带毒率和病毒载量较高, 这是免疫鸡群仍发生非典型 ND 的主要原因。因此新疫苗的研制应将降低流行株攻击后排毒和病毒载量作为免疫效力评价的重要内容。同时研究结果还显示, 只有疫苗株与流行毒株高度同源时方能产生理想的免疫保护效力: 不仅对流行株攻击提供高度的临床保护, 而且能有效降低排毒和病毒的载量。自上世纪 90 年代末以来, 引起我国 ND 流行的优势毒株为基因 V II_d 亚型, 而最常用的 ND 疫苗为基因 II 型弱毒株 La Sota, 优势流行毒株与疫苗株相比, 遗传距离越来越远, 因此即使常用疫苗可诱导产生高滴度 H 抗体, 但在流行株强毒攻击后, 免疫鸡的喉气管和泄殖腔中仍可含有较高滴度的病毒载量, 从而为免疫鸡群中流行毒株的传播提供了机会。国内外实验室研究业已证明: 使用与流行株同型的基因 V II 型疫苗可以有效降低免疫鸡群中 NDV 强毒的携带量及感染率^[32-33], 这种新型疫苗对控制

我国 ND 流行有着非常广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, *et al* Pathotypal and Genotypal Characterization of Strains of Newcastle Disease Virus Isolated from Outbreaks in Chicken and Goose Flocks in Some Regions of China During 1985 - 2001 [J]. Arch Virol, 2003, 148 (7): 1387 - 1403.
- [2] Wan H Q, Chen L G, Liu X F, *et al* Newcastle Disease in Geese: Natural Occurrence and Experimental Infection [J]. Avian Pathol, 2004, 33 (2): 216 - 221.
- [3] 宋战胜, 王晶钰, 赵 伟, 等. 鸭源新城疫病毒的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2007, 28 (5): 22 - 25
- [4] 张训海, 朱鸿飞, 陈溥言, 等. 鸭副粘病毒强毒株的分离和鉴定 [J]. 中国动物检疫, 2001, 18 (10): 24 - 26.
- [5] Qin Z M, Tan L T, Xu H Y, *et al* Pathotypal Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Hosts in China from 1996 to 2005 [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (2): 601 - 611.
- [6] Kapczynski D R, King D J. Protection of Chickens against Overt Clinical Disease and Determination of Viral Shedding Following Vaccination with Commercially Available Newcastle Disease Virus Vaccines upon Challenge with Highly Virulent Virus from the California 2002 Exotic Newcastle Disease Outbreak [J]. Vaccine, 2005, 23 (26): 3424 - 3433.
- [7] Rauw F, Gardin Y, Palya V, *et al* Improved Vaccination against Newcastle Disease by an in ovo Recombinant HVT - ND Combined with an Adjuvanted Live Vaccine at Day - old [J]. Vaccine, 2009, 28: 823 - 833.
- [8] Lamb R A, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the Viruses and Their Replication In: Fields BB, Knipe DM, Howley RM, editors Fundamental Virology [M]. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 2002: 1305 - 1340.
- [9] Huang Y, Wan H Q, Liu X F, *et al* Genomic Sequence of an F

- solate of Newcastle Disease Virus Isolated from an Outbreak in Geese: a Novel Six Nucleotide Insertion in the Non - coding Region of the Nucleoprotein Gene [J]. Arch Virol, 2004, 149 (7): 1445 - 1457.
- [10] Zou J, Shan S, Yao N, *et al* Complete Genome Sequence and Biological Characterizations of a Novel Goose Paramyxovirus - SF02 Isolated in China [J]. Virus Genes, 2005, 30 (1): 13 - 21.
- [11] Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, *et al* Third Genome Size Category of Avian Paramyxovirus Serotype 1 (Newcastle Disease Virus) and Evolutionary Implications [J]. Virus Res, 2006, 120 (1/2): 36 - 48.
- [12] Seal B S, Wise M G, Pedersen J C, *et al* Genomic Sequences of Low - virulence Avian Paramyxovirus - 1 (Newcastle disease virus) Isolates Obtained from Live - bird Markets in North America not Related to Commonly Utilized Commercial Vaccine Strains [J]. Vet Microbiol, 2005, 106 (1/2): 7 - 16.
- [13] Liu X W, Wang X Q, Liu X F, *et al* Surveillance for Avirulent Newcastle Disease Viruses in Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at Live Bird Markets in Eastern China and Characterization of the Viruses Isolated [J]. Avian Pathol, 2009, 38 (5): 377 - 391.
- [14] Mase M, Inai K, Sanada Y, *et al* Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Genotypes Isolated in Japan [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (10): 3826 - 3830.
- [15] Liu H, Wang Z, Wu Y, *et al* Molecular Epidemiological Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated in China in 2005 [J]. J Virol Methods, 2007, 140 (1/2): 206 - 211.
- [16] Liu H, Wang Z, Wu Y, *et al* Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of New Newcastle Disease Virus Isolates from the Mainland of China [J]. Res Vet Sci, 2008, 85 (3): 612 - 616.
- [17] 姚春峰, 刘文博, 刘秀梵, 等. 新城疫病毒分离株的生物学特性鉴定及 F 蛋白基因序列分析 [J]. 病毒学报, 2009, 25 (2): 117 - 124.
- [18] 仇旭升, 孙庆, 刘秀梵, 等. 两株基因 III 型强毒新城疫的全基因组测序及其与 I 系苗的亲缘性分析 [J]. 微生物学报, 2009, 49 (3): 302 - 307.
- [19] Lin M Y, Liu H J, Ke G M. Genetic and Antigenic Analysis of Newcastle Disease Viruses from Recent Outbreaks in Taiwan [J]. Avian Pathol, 2003, 32 (4): 345 - 350.
- [20] 李志杰, 毕玉海, 丁壮, 等. 鹅副黏病毒与鸡新城疫病毒抗原变异关系的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29 (3): 322 - 324.
- [21] 秦卓明, 马保臣, 崔治中, 等. 新城疫病毒 HN 和 F 基因遗传变异相关性的研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46 (2): 227 - 232.
- [22] Yu L, Wang Z, Jiang Y, *et al* Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Virus Isolates from the People's Republic of China and Taiwan [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 3512 - 3519.
- [23] Cho S H, Kwon H J, Kim T E, *et al* Variation of a Newcastle Disease Virus Hemagglutinin - neuraminidase Linear Epitope [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46: 1541 - 1544.
- [24] Peeters B P H, Olav S D E leeuw, Iwan V, *et al* Generation of a Recombinant Chimeric Newcastle Disease Virus Vaccine That Allows Serological Differentiation between Vaccinated and Infected Animal [J]. Vaccine, 2001, 19: 1616 - 1627.
- [25] Briot R M, Syddall R J, Sheehan J P, *et al* Neutralization Map of the Hemagglutinin - neuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus: Domains Recognized by Monoclonal Antibodies That Prevent Receptor Recognition [J]. J Virol, 1991, 65 (9): 4999 - 5006.
- [26] Hu S L, Wang T Y, Liu X F, *et al* Identification of a Variable Epitope on the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin - neuraminidase Protein [J]. Vet Microbiol, 140: 92 - 97.
- [27] Ezema W S, Okoye J O A, Nwanta J A. La Sota Vaccination may not Protect against the Lesions of Velogenic Newcastle Disease in Chickens [J]. Trop Anim Health Pro, 2009, 41: 477 - 484.
- [28] Miller P J, Afonso C L. Antigenic Differences among Newcastle Disease Virus Strains of Different Genotypes Used in Vaccine Formulation affect Viral Shedding after a Virulent Challenge [J]. Vaccine, 2007, 25 (41): 7238 - 7246.
- [29] Miller P J, Estevez C, Yu Q, *et al* Comparison of Viral Shedding Following Vaccination with Inactivated and Live Newcastle Disease Vaccines Formulated with Wild - type and Recombinant Viruses [J]. Avian Dis, 2009, 53 (1): 39 - 49.
- [30] Jeon W J, Lee E K, Lee Y J, *et al* Protective Efficacy of Commercial Inactivated Newcastle Disease Virus Vaccines in Chickens against a Recent Korean Epizootic Strain [J]. J Vet Sci, 2008, 9 (3): 295 - 300.
- [31] Neumann G, Whitt M A, Kawaoka Y. A decade after the Generation of a Negative - sense RNA Virus from Cloned cDNA - What Have We Learned? [J]. J Gen Virol, 2002, 83: 2635 - 2662.
- [32] Cho S H, Kwon H J, Kim T E, *et al* Characterization of a Recombinant Newcastle Disease Virus Vaccine Strain [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15 (10): 1572 - 1579.
- [33] Hu S L, Ma H L, Liu X F, *et al* A Vaccine Candidate of Attenuated Genotype VII Newcastle Disease Virus Generated by Reverse Genetics [J]. Vaccine, 2009, 27: 904 - 910.