

DOI: 10.13376/j.cblls/2016038

文章编号: 1004-0374(2016)03-0295-08



刘秀梵, 教授, 博士生导师, 动物传染病学专家。2005年当选为中国工程院院士, 2015年入选世界兽医家禽协会荣誉堂。他主要从事畜禽传染病流行病学与发病机理研究。在禽流感、新城疫等重要动物传染病的流行病学与致病机理方面开展了系统的研究工作, 先后研制出用于禽流感(H9N2亚型)、鸡传染性法氏囊病和新城疫等疫病预防的7种新型疫苗, 取得了新兽药注册证书, 并在全国范围内得到了推广应用, 产生了显著的经济与社会效益。先后获国家科技进步奖二等奖1项、部省级科技进步奖一等奖3项; 曾获中国农业英才奖和何梁和利科技创新奖。他主编了《兽医流行病学》和《单克隆抗体在农业上的应用》, 在国内外学术刊物发表论文400多篇, 培养博、硕士研究生160多名, 指导1篇博士学位论文被评为全国百篇优秀博士学位论文。

新城疫病毒的遗传进化

胡顺林, 刘秀梵*

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要: 新城疫病毒属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属(*Avulavirus*), 病毒的基因组为单股、负链、不分节段的RNA, 因此, 病毒基因组自身变异的频率较高, 是新城疫病毒进化的主要因素。同时, 新城疫病毒的多宿主特性和疫苗的频繁使用等因素对病毒的进化也起到了促进作用。病毒在进化过程中出现了多个基因型和基因亚型, 并导致了病毒宿主感染范围的扩大、毒力的多样性和抗原性的变异。

关键词: 新城疫病毒; 基因组; 进化; 基因型

中图分类号: Q939.47; S852.65 文献标志码: A

The heredity and evolution of Newcastle disease virus

HU Shun-Lin, LIU Xiu-Fan*

(Key Laboratory of Animal Infectious Disease, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Newcastle disease virus (NDV) is a member of the genus *Avulavirus* in the family Paramyxoviridae. The genome of NDV is a non-segmented, single-stranded, negative-sense RNA. Therefore, the frequency of genomic variation is relatively high due to the inherent error rate of the RNA polymerase-dependent RNA replication, which is the main driving force for virus evolution. Additionally, the multiple host range for NDV and frequent vaccination for the control of ND also promote the NDV evolution. During the evolution, NDV has generated variants of multi-genotypes and subgenotypes, resulting in expanded host range, virulence diversity and antigenic variations.

Key words: Newcastle disease virus; genome; evolution; genotype

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是一个持续进化的病毒, 虽然只有一个血清型, 但有多个基因型, 而不同基因型毒株的生物学特性之间存在较明显的差异。自1926年以来, 新城疫在世

收稿日期: 2016-01-03

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303033);

国家科技支撑计划(2015BAD12B03)

*通信作者: E-mail: xfiu@yzu.edu.cn

界范围内已发生四次大流行,对家禽养殖业造成了极大的经济损失,每次流行都由新的基因型或基因亚型的毒株所引发。NDV属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属,是一种有囊膜的单股、负链、不分节段的RNA病毒。NDV的复制依靠RNA依赖性的RNA聚合酶,在复制过程中该聚合酶缺乏校对功能,因此,病毒基因组的突变率相对较高,在复制中会产生大量的准种。在自然选择条件下,部分准种的生存优势逐步显现,并得以在自然界中传播,一定程度上促进了病毒的进化,同时,宿主、环境、免疫压力等因素的作用也会对病毒的进化产生影响。

1 病毒进化动力学

1.1 新城疫病毒的基因突变

NDV属于单股负链RNA病毒,具有RNA病毒共有的特征,其RNA聚合酶缺乏有效的RNA校正功能,病毒自我纠错能力有限,加上病毒本身具有较高的复制效率,使得病毒基因自身的变异率相对于DNA病毒来讲要高得多。

1.1.1 自然状态下的NDV变异

点突变是NDV变异的主要方式,其根本原因是RNA聚合酶缺乏校正能力,NDV的基因组结构模式为3'-NP-P-M-F-HN-L-5',依次编码6种结构蛋白:核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和聚合酶蛋白(L)^[1]。Chong等^[2]对世界上不同时期、不同地域、不同宿主来源的54个NDV代表株全基因组中的各基因片段,分别进行了生物信息学统计分析,发现NDV病毒各基因均存在核苷酸的突变,且不同基因之间的突变率有一定差异,其中P基因变异的频率最大,其次是F和HN基因。美国农业部东南禽病研究所Miller等^[3]利用生物信息学方法,结合大量的NDV基因组序列,对影响NDV基因组变异的进化因素进行了分析和评估,发现在NDV基因组编码的6个蛋白中,以F蛋白的变异频率最高。除少数蛋白上的位点处于阳性选择外,总体来说,病毒的6个主要结构蛋白均处于较强的阴性选择状态。同时,Miller等^[3]的研究还发现在来源于野鸟的毒株中,强毒株基因组的年变异率要高于弱毒株,由此推测病毒毒力的增强可以加速NDV毒株的进化。

1.1.2 免疫选择压造成的影响

疫苗免疫是预防新城疫的重要途径和方法。在长期的疫苗免疫选择压下,病毒的基因组往往会发

生突变,特别是F和HN基因编码的蛋白位于病毒粒子的表面,面临的免疫选择压力相对较大。山东农业大学巩艳艳等^[4]通过抗体与病毒同时孵育的方法,在细胞上研究了新城疫抗体对NDV HN基因和F基因变异的影响。其研究结果发现,有抗体组HN基因发生突变的位点数明显多于无抗体组,且非同义突变(NS)与同义突变(S)比值NS/S为6,明显高于无抗体组的NS/S比值3.4;在有抗体组,有5个核苷酸位点发生稳定的非同义突变,而且其中3个与已知的抗原表位密切相关。F基因在有抗体组也出现了2个稳定的突变,而在无抗体组未发生变化。扬州大学Gu等^[5]通过序列分析后发现,HN蛋白上存在3个阳性选择位点(266、347和540位),且这3个位点在疫苗株与流行株上存在明显差异。

1.2 NDV的重组

NDV基因组为单股负链不分节段的RNA,一般认为发生基因重组的概率较低。2003年,Chare等^[6]最早报道了NDV重组的现象。他们在进行负链RNA遗传进化的研究中,对来源于35个负链RNA病毒中79个不同基因片段的2154条序列进行了分析,发现至少有5种病毒有重组现象,其中就包括NDV。最早发现的两株重组NDV,一株来自中国的鹅源新城疫强毒GPMV/QY97-1(简写QY97-1),是最早在国内分离的基因VII型NDV之一;另一株则是来自墨西哥的chicken/Mexico/37822/96。序列分析表明,QY97-1株HN蛋白5'端1~273个氨基酸序列与我国目前广泛流行的VII型NDV代表株ZJ/1/00/Go同源性达97.7%,而274~570氨基酸序列则与我国的经典强毒株F₄₈E₉的同源性达99.7%,因此,认为QY97-1株的HN基因是F₄₈E₉和基因VII型NDV的HN基因发生重组的产物。而Mexico毒株的重组则发生在NP基因,是chicken/Mexico/37822/96和chicken/Italy/Milano/45的重组,这两个亲代毒株分别来自欧洲和美洲且时间跨度超过了50年。2010年,Chong等^[2]通过对GenBank中NDV基因组序列的分析发现,来自中国的基因VII型鹅源毒株NA-1(其L基因有基因VI型片段的重组)、来自印尼的基因VII型Cockatoo源毒株(NP基因有基因II型片段重组)、来自意大利的鸽源基因VIb亚型毒株(M基因有基因II型片段重组)和来自中国的HB92株(M和L基因源于V4,其他基因源于LaSota)均发生了重组。

近年来, 关于 NDV 重组的报道不断增多, 而且大多数重组病毒发生在中国。2008—2011 年期间, 国内至少有 5 个实验室在国际上报道了 NDV 的重组事件^[7-12], 这引起研究者的广泛关注。

从上述有关 NDV 重组的报道来看, 似乎 NDV 基因重组不是稀有事件, 而是普遍发生的事件, 概率比较高的事件。但是, 这些作者都忽视了这样的事实: 他们判定发生重组的依据是这些毒株的 RNA 经 RT-PCR 方法扩增所测得的基因序列, 而如果样品中混有两种 NDV 毒株, 则 PCR 扩增时聚合酶模板变换, 就可导致人为重组; 同时, 实验室内也可能产生重组体。美国农业部东南家禽研究所资深研究员 Afonso^[13], 于 2008 年在中国学者连续报道 3 篇 NDV 重组的文章后, 就写信给 *Journal of Virology* 指出了这一点。同时, 他还强调, 还没有一个报告能确定 NDV 的重组事件产生了自然子代病毒。为了进一步搞清楚所报道的 NDV 重组事件是否都是真正自然发生的重组事件, 还是混有实验室发生的人工重组, Song 等^[14]进行了一系列研究。他们用 5 种不同的统计学方法分析了 GenBank 中 80 株 NDV 的全基因组序列, 发现至少有 8 株病毒有重组事件, 重组率高达 10%, 而且其中的 5 株病毒有多个重组事件发生在基因 I、II、III 型疫苗毒株和当前呈优势流行的基因 VII 型毒株之间。但对根据 GenBank 中公布的序列被确定为重组的两株病毒, China/Guangxi09/2003 和 NDV/03/018, 进行蚀斑纯化后重新测序, 发现原先的重组根本不存在, 证明其是 PCR 扩增过程中模板改变而引起的人工重组, 因为原先的 China/Guangxi09/2003 和 NDV/03/018 样品中经验证的确混有基因 III 型病毒^[14]。Song 等的研究说明, 在 GenBank 上登录的 NDV 基因序列有一些是不准确的, 这会影响对 NDV 进化的生物信息学分析。所以, 对 NDV 重组事件的判定应持慎重态度, 为避免出错, 第一要检查测序的原始样品是否混有不同基因型的病毒; 第二是将重组病毒传代、纯化后测序, 证明其后代也是重组病毒。

2 NDV的进化

自从 1926 年以来, 新城疫在世界范围内共发生了 4 次大流行。第一次新城疫大流行发生在 20 世纪 60 年代以前, NDV 流行株主要是基因 II、III 和 IV 型的毒株, 危害的对象主要是鸡, 历时近 30 年, 经亚洲和欧洲传至世界各地; 第二次新城疫大流行的源头在中东, 时间在 1960—1970 年代, 基因型

为 V 型和 VI 型, 病原来源于鸚鵡类禽种; 第三次新城疫大流行源头在中东的鸽, 时间为 1980—1990 年, 基因型为 VIb 亚型; 自 20 世纪 90 年代以来, 新城疫一直处于第四次大流行, 源头在亚洲远东地区, 基因型主要是 VII 型^[15]。除基因型发生变化外, NDV 进化还表现在感染宿主范围的扩大、病毒毒力和抗原性改变等方面。

2.1 NDV基因组的演化

目前, 一般将 NDV 分为两个大的谱系 I 类(class I) 和 II 类(class II)。I 类毒株基因组全长均为 15 198 nt; 而 II 类病毒的基因组长度有 15 186 nt 和 15 192 nt 两种, 基因组长度的差异是 NDV 进化过程中出现的重要历史特征^[16]。按传统的 NDV 分类, class II 中的 NDV 主要有基因 I~IX 9 个基因型, 包括了 1960 年之前出现的基因 I~IV 型病毒, 即早期病毒, 其基因组全长为 15 186 nt; 1960 年之后出现的基因 V~VIII 型病毒, 即晚期病毒, 其基因组全长为 15 192 nt; 而基因 IX 型病毒在出现时间上和遗传发生上属早期病毒, 但其具有晚期病毒的基因组全长, 即 15 192 nt。IX 型 NDV 毒株与基因 V~VIII 型毒株一样, NP 基因 5' NCR 也存在 6 nt 的插入, 因此, 其基因组长度为 15 192 nt。IX 型 NDV 中的 F48 分离于 1946 年, 是目前最早分离到的 15 192 nt 基因组长度毒株, 暗示 15 192 nt 基因组长度的毒株早在 20 世纪 40 年代就已经出现, 基因组长度的改变是一个早期事件^[17]。

由此, 可以推测基因 IX 型是介于早期毒株和晚期毒株之间的过渡毒株。晚期基因型毒株可能由此类过渡性病毒进化而来, 15 192 nt 基因组的出现归于早期毒株在 NP 基因 5' NCR 插入了 6 nt^[18]。I 类毒株的基因组的特点也可以作为间接的证据证明 15 192 nt 长度的基因组由 15 186 nt 长度的进化而来, I 类毒株被认为是 NDV 的原始病毒, 其 NP 基因和 II 类的基因 I~IV 型 NDV 一样, 不存在 6 nt 的插入。

I 类 NDV 基因组的长度为 15 198 nt, 与 II 类毒株相比, I 类病毒的 P 基因阅读框内多出了 12 个 nt^[16]。由于 I 类毒株是 NDV 的原始病毒库, 由此推测 I 类病毒在鸡群内广泛传播后产生了 II 类的毒株, 在此过程中 P 基因丢失了 12 nt。根据 NDV 发生的历史事件, 推测自然界中最早出现了病毒基因组长度为 15 198 nt 的 I 类病毒, 该病毒在 P 基因缺失 12 nt 后出现了基因组的长度为 15 186 nt 的早期的基因型 II 类毒株, 之后的进化过程中早期基因型毒株在 NP 基因 5' NCR 插入了 6 nt, 进而产生了晚期的基

因 V~VIII 型毒株。

2012 年, 在西非出现了基因组长度为 15 198 nt 的基因 VII 型 NDV, 该毒株完全符合晚期基因型毒株的特征, 只不过在 HN 与 L 基因的间隔区又插入了 6 nt^[19]。

研究表明, 根据 NDV 毒株的基因组全长绘制的遗传发生树, 与 6 个基因的编码区核苷酸序列分别绘制遗传发生树, 和基于 F 基因 47~420 nt 位核苷酸序列的遗传发生树所显示的 NDV 的演化规律基本一致, 说明 NDV 的演化是在基因组的整体水平上同步进行的, 基因组在演化过程中先后出现了 I 类和 II 类两大分支, 同时出现了上述的多个基因型。

2.2 NDV 宿主范围的演化

随着 4 次世界范围内 NDV 的大流行和疫苗的广泛和频繁使用, NDV 的宿主范围随之明显扩大。由于 NDV 的毒力不同、宿主的年龄和品种等原因, 导致 NDV 对不同遗传背景宿主的致病性差异较大。

2.2.1 水禽

水禽是新城疫弱毒株的天然贮存库, 水禽和海岸鸟感染 NDV 无毒株的比例较高, 这些病毒在禽类中不引起任何临床症状。关于美国活禽市场和海岸鸟的无毒新城疫分离株的遗传进化分析显示, 这些病毒中的 70% 属于 I 类病毒, 30% 属于 II 类病毒。其中近乎半数的 I 类病毒来源于野鸭。水禽和海岸鸟同时也是 II 类 NDV 的携带者, 这些 II 类病毒主要属于基因 I 型和 II 型^[20]。

水禽曾被认为对 NDV 强毒具有极强的抵抗力, 鹅、鸭等能携带 NDV, 但通常状态下不表现任何的临床症状, 即使是强毒感染也不表现明显症状, 仅表现为带毒。但是近年来, NDV 出现了某些新的致病特点, 特别是对鹅表现出较强的致病性, 其致病类似于鸡新城疫。1997 年, 在我国华南和华东地区爆发引起鹅高发病率和高死亡率的新城疫疫情后, 科研人员才开始重视水禽在 NDV 储存和传播中的作用^[21]。引起鹅大面积发病的 NDV 主要为基因 VII 型, 它们与鸡源 VII 型 NDV 在遗传发生、免疫原性和致病性上均无明显差异, 且无宿主特异性^[22], 推测是新出现的基因 VII 型病毒对鹅具有强致病性。近年来鸭感染 NDV 的报道也屡见不鲜, 提示 NDV 对水禽的危害进一步增加。

2.2.2 鸽

鸽 NDV 被认为是经典新城疫病毒的变异株, 这种变异株病毒最早出现于中东地区, 后迅速传播到欧洲并造成 1980 年代初的大流行。最近几年,

该病毒在全世界范围内很多国家分离到, 说明自从 1980 年代以来该病毒已经在全世界范围内长期存在和流行。鸽 NDV 不同的分离株对鸡的致病性有较大的差别。根据核苷酸序列推导的氨基酸序列组成来看, 所有鸽 NDV 分离株的 F 基因裂解位点都具有强毒特性, 但有些鸽 NDV 分离株却对鸡表现出中等毒力或者低毒力^[23]。虽然其他基因型的 NDV 也可感染鸽, 特别是基因 VIIId 亚型人工感染时, 甚至比 VIb 亚型对鸽的致病性还要强, 但从鸽分离到的 NDV 绝大多数为基因 VIb 亚型, 因此, 该亚型对鸽有明显的宿主特异性。研究表明, 虽然基因 VIb 亚型 NDV 对鸽的致病性没有基因 VIIId 亚型强, 但是其感染鸽后的病毒载量和带毒排毒时间均大于基因 VIIId 亚型病毒, 从另一侧面说明基因 VIb 亚型病毒对鸽的特殊嗜性。

Chong 等^[24]对鸽 VIb 亚型 NDV 的起源和进化进行了较详细的研究, 表明早期的 VIb 亚型鸽 NDV 与 1960 年代出现的鸡源基因 VIa 亚型的亲缘关系很近, 这与根据全基因组进化速率推算出的其最近祖先病毒出现时间完全一致, 因此, 证实 VIb 型鸽 NDV 是鸡源基因 VIa 亚型感染鸽后产生适应性进化的产物。

2.2.3 其他禽鸟类

到目前为止, 除了鸡、家养水禽、鸽外, 鸵鸟、麻雀、鸚鵡、鹤鹑、山鸡、鸬鹚、鹧鸪、孔雀等均可感染 NDV 强毒并发病, 已知能自然或人工感染 NDV 的鸟类超过了 250 多种, 种种现象表明, NDV 感染的宿主范围正在逐渐扩大。

2.2.4 哺乳动物

我国自 1999 年以来局部地区也不断有猪副黏病毒病发生的报道^[25-26]。采集死亡猪的肠道内容物和内脏组织进行负染电镜观察, 可见病毒粒子有典型的副黏病毒特征。我国猪源 NDV 的出现可能是由于一些地区存在猪和鸡混养的模式, 造成使用在家禽上的疫苗株感染。另外, 有一些基层兽医人员把 ND 疫苗作为干扰素诱导剂使用, 如报道在临床上使用新城疫 I 系苗预防或治疗新生仔猪流行性腹泻或其他疾病。因此, 有可能是在临床上使用了新城疫疫苗防治猪病而造成猪的感染。由于分离到的猪源 NDV 的 F 及 HN 基因与使用的 NDV 疫苗株, 如 LaSota 疫苗株存在很高的同源性, 其来源于家禽的疫苗病毒是没有疑问的。但是对所有从猪分离到 NDV 与发生猪病的联系, 都必须进一步研究才能下结论, 目前没有任何证据说明 NDV 可以引发

猪的临床疾病。我们应密切关注在猪群中使用大剂量 NDV 疫苗可能产生的严重后果。

人也能感染 NDV, 可引起急性结膜炎, 偶尔也可侵害角膜。多数病例病程为 7~10 d, 不经治疗就可康复, 目前还没有人传染人的报道。2007 年报道了从一肺炎死亡病例中分离出一株 NDV, 剖检后免疫组化确认了在脱落的肺泡细胞中存在这种 NDV^[27], 分离株 F 蛋白裂解位点具有典型的 NDV 强毒特征。

2.3 NDV 毒力的进化

在 NDV 中, class I 病毒主要为无毒和弱毒型; class II 病毒的 9 个基因型中, I 型为弱毒(1998—2000 年澳大利亚出现的 I 型强毒株除外); II 型中有强毒、中强毒和弱毒株; III 型至 IX 型中除了部分鸽源 VIIb 亚型病毒为中等毒力外, 其他分离株均为强毒。

2.3.1 NDV 弱毒的进化

NDV 最早以弱毒的形式在自然界中广泛传播, 在某种自然条件下, 弱毒株可以通过基因组突变进化成为强毒株。甚至, 从流行病学资料和间接的实验证据都可以看出, 弱毒株向强毒株的演化并非偶然事件。

1998 年, 澳大利亚发生了 NDV 强毒的爆发流行, 证明分离到的强毒株是从原先鸡群中的弱毒株演变进化而来的。澳大利亚曾于 1930 年左右分离到无毒的 NDV 毒株——AV 株, 1933—1966 年间, 澳大利亚被认为是无 NDV 感染国家。20 世纪 80 年代到 1998 年期间, 澳大利亚又分离到数株低毒力 NDV 毒株。1998 年, 在悉尼市的 Peat's Ridge 发生了以晚期呼吸道症状为主的新城疫, 经鉴定为弱毒(ICPI 值为 0.41, F 蛋白裂解位点序列为: ¹¹²RRQGRL¹¹⁷)。两个月后在悉尼的 Dean Park 分离到了 NDV 强毒株(ICPI 为: 1.60~1.70, F 蛋白裂解位点序列为: ¹¹²RRQRRF¹¹⁷)。在随后的两年间, 澳大利亚多个地区相继发生了 ND, 并分离到多株 NDV 强毒, 虽然这些毒株的 F 蛋白裂解位点序列为 ¹¹²RRQRRF¹¹⁷, 但在遗传关系上与 Peat's Ridge 株密切相关, 而且在许多鸡场分离到 NDV 强毒株前, 都曾检测到 Peat's Ridge 株的感染, 从而进一步证实澳大利亚 1998—2000 年发生的 NDV 强毒爆发流行与之前分离到的弱毒 NDV 有着紧密的遗传关系, 在此期间 NDV 经历了由弱毒到强毒的演化过程。澳大利亚发生的此起事件, 是 II 类毒株中基因 I 型 NDV 在自然界由弱毒进化为强毒的最经典例子^[28]。

虽然目前从野生水鸟和活禽市场分离到的 I 类

NDV 病毒均为无毒株或弱毒株, 但是一些实验室在对早期收集的新城疫毒株进行追溯性研究时发现, I 类 NDV 强毒株也曾出现过流行。1992 年, 在非新城疫区的爱尔兰爆发的 NDV 强毒感染, 造成了严重的经济损失, 序列分析显示引起此次流行的强毒株属于 I 类病毒分支, 与此前分离的 I 类 NDV 弱毒株高度同源, 说明 I 类毒株中出现的 NDV 强毒株由弱毒株进化而来^[29]。

Yu 等^[30]将水禽中分离到的无致病性裂解位点序列为 ¹¹²ERQERL¹¹⁷ 的 I 类 NDV 无毒株经鸡气囊连续传代(a), 第 8 代(8a)之前所得病毒均无明显致病力, 但传至第 9 代(9a)时, 病毒呈现出了中等毒力。再将第 9 代病毒经鸡脑内进行传代(b)后发现, 第 1 代(9a1b)病毒的毒力基本没变, 而传至第 5 代(9a5b)时病毒表现出标准的强毒株特征(MDT、ICPI、IVPI 分别为 56 h、1.88、2.67), 能感染鸡的各种组织, 且毒株 9a5b F 蛋白裂解位点序列由最初的 ¹¹²ERQERL¹¹⁷ 变为了 ¹¹²KRQKRF¹¹⁷, 上述结果同样表明, F 蛋白的裂解位点序列对毒力影响至关重要。

由上可知, 不管通过人工传代还是自然选择, 弱毒 NDV 的毒力均可能发生增强, 并且这种毒力的改变与 F 基因裂解位点的核苷酸突变相关。因此, 对弱毒 NDV 进行持续的监测与病原生态学研究也是十分必要的。

2.3.2 NDV 强毒的进化

2009 年, 仇旭升等^[31]从发病禽群中分离到了两株 III 型 NDV(JS/7/05/Ch 和 JS/9/05/Go), 虽然两株基因 III 型 NDV 与 Mukteswar 株基因和蛋白序列的同源性均高达 99% 以上, 表明该分离株由 I 系苗进化而来, 但就其毒力而言, JS/7/05/Ch (IVPI = 2.18) 和 JS/9/05/Go (IVPI = 1.33) 明显高于疫苗株 Mukteswar (IVPI = 0.08), 说明 I 系苗在使用过程中出现了毒力增强^[31]。

在墨西哥, 1998—2006 年间分离到的 NDV 都属于 class II 中的基因 V 型。但是, 这些病毒却在遗传进化上明显的分属于两个分支, 一个归为早期分支(1998—2001 年), 另一个归为近期分支(2004—2006 年)。研究发现 1998—2001 年间分离的病毒与 2004—2006 年分离的病毒只有 93%~94% 的同源性, 这说明 1998—2001 年间的病毒受到了某种选择压力的作用, 这种作用导致了新分支病毒的出现, 进一步研究发现 2004—2006 年分离病毒的毒力与 1998—2001 年分离毒株相比出现了明显

的增强^[32]。

在基因 VI 型 NDV 中最早出现的毒株为 VIa 亚型,之后出现了 VIb、VIc 和 VI d 亚型。研究表明,后面 3 个亚型的毒株均由 VIa 亚型毒株进化而来。VIb 亚型 NDV 是 VIa 亚型感染鸽后在鸽体内进化的产物,VIc 和 VI d 亚型毒株仍为鸡源毒株,但毒力与 VIa 亚型毒株相比有所增强。

基因 VII 型 NDV 是当前世界上的优势流行株,虽然 VII 型 NDV 的毒力指标和其他强毒株相似,但该型对脾脏和肠道淋巴组织的损伤程度明显重于早期基因型的强毒株,如 Herts33 (基因 IV 型)等^[33]。VII 型 NDV 感染 SPF 试验鸡和鹅后,试验动物的脾脏会表现严重的坏死病变,出现大理石样的白色坏死灶;肠道主要表现为出血及坏死病变,严重者遍及整个肠道和泄殖腔,肠黏膜表面有数量不等、大小不一的黄白色坏死点^[21]。2011 年,美国佐治亚大学 Susta 等^[34]分别用基因 II 型、V 型和 VII 型新城疫强毒感染 4 周龄 SPF 试验鸡,试验结果同样显示,VII 型毒株感染鸡的脾脏、胸腺、法氏囊及盲肠扁桃体的病变程度均明显重于 II 型和 V 型毒株。同时,美国农业部东南禽病研究所研究的结果还证实,基因 VII 型 NDV 感染后可诱发强烈的宿主应答反应,产生大量的 IFN- γ 、IL-6 等细胞因子^[35],并且可以诱导明显的细胞凋亡,宿主细胞强烈的应答与机体组织病理学的变化具有明显的相关性。与早期毒株相比,基因 VII 型毒株更易在免疫鸡群中感染和传播,推测这种现象可能与 VII 型毒株对宿主免疫系统侵害能力的增强有关。

2.4 新城疫病毒的抗原性进化

1983 年,Russell 和 Alexander^[36]利用 NDV Ulster 2C 制备了 9 株单克隆抗体,通过单抗排谱方法将 40 个 1981 年之前的 NDV 分离株分为 A~H 8 个抗原群,同一群毒株与这些单抗的反应谱相同,且同群的毒株具有相同的生物学和流行病学特征。他们研究发现,上述 9 株单抗与鸽新城疫毒株的反应谱系不同于上述的 8 个抗原群毒株,因此,将鸽源 NDV 分离株归为 P 群,认为鸽源 NDV 是鸡源 NDV 的变异株。徐秀龙和刘秀梵^[37]以 3 种不同毒力型的 NDV 为免疫抗原,获得 21 株单克隆抗体,应用这些单克隆抗体与国内外的 27 株参考毒株和 8 株野外分离毒株进行中和试验、血凝抑制试验和溶血抑制试验,结果有 15 株单克隆抗体能与所有被试的 NDV 毒株发生反应。另外,6 株单克隆抗体能够鉴别出 NDV 毒株的抗原差异,根据试验结果

将 35 株 NDV 分为 7 个群,同一群内 NDV 的重要流行病学特征和生物学特性极其相似。在 2004 年,Tsai 等^[38]对 1969—1996 年间分离自台湾的 36 株 NDV 进行抗原性分析,22 株单抗将 36 株 NDV 分为 C1、P、E、G、H 群以及 1 个未定型群。

但近年来,新城疫疫苗在鸡群中频繁使用,在高强度持续的免疫压力下病毒的抗原发生了变化。交叉中和试验结果表明,常用疫苗株与部分流行株之间的抗原性存在差异。台湾学者 Lin 等^[39]对基因 II 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 0.15~0.5 之间,从而证明流行株与疫苗株之间存在明显的抗原差异。韩国学者 Cho 等^[40]对一株基因 VII d 亚型 NDV 和疫苗株 LaSota 进行了交叉中和试验,结果发现它们之间的 R 值仅为 0.18,并且发现该流行株与疫苗株制备的血清与流行株进行中和试验时,流行株血清对自身的中和效价竟是疫苗株血清对其效价的 128 倍,表明毒株之间存在明显的抗原差异。2008 年,Qin 等^[11]通过疫苗的交叉保护试验发现,疫苗株对部分流行株不能提供理想的免疫保护。目前普遍认为,疫苗株与流行株之间的基因型和抗原性差异是引起免疫鸡群感染强毒的主要原因之一。

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^[41]。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^[42]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,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。流行株与基因 I 和 II 型疫苗株的 HN 蛋白序列的比对分析结果显示,流行株 HN 蛋白在这些区域或邻近的氨基酸序列与疫苗株存在明显的不同,其中大部分氨基酸的改变都可涉及到极性、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存在着抗原性差异。

研究发现近年来 HN 蛋白第 347 位残基发生 E 到 K 突变的毒株分离率正呈上升趋势,该变异点位于抗原显性决定簇的 345~353 位,对抗原性改变起关键作用^[43]。2010 年,Cattoli 等^[44]分析了 10 个 2008 年非洲分离株的 HN 序列,发现有 6 个毒株在

该决定簇发生了突变; Cho 等^[40]研究发现在 2008 年韩国流行分离株中该类变异株已占到 80%。研究数据显示, 2009 年以来该变异株已占到了我国华东地区分离株的 70% 左右。上述结果表明, 此类变异株在世界上已呈流行趋势, 因此, 该类变异株的出现应得到高度重视。

3 新城疫病毒进化对疫苗免疫效力的影响

目前国内外使用的疫苗株主要属于基因 I 型和 II 型, 其中使用最广泛的疫苗株 LaSota 为基因 II 型, 其分离于 1946 年, 距今已近 70 年。NDV 是一种持续进化的病毒, 近 70 年来已先后出现了多个基因型, 随着时间的推移, 流行株与疫苗株的遗传距离越来越远, 抗原性的差异也有所增大, 因此, 流行株与疫苗株基因型之间的差异被认为是免疫鸡群中发生非典型 ND 的主要原因。国内外实验室研究已证明, 使用与流行株相同基因型的疫苗株可以有效预防 NDV 流行强毒株的感染^[45]。

目前我国 NDV 流行毒株的优势基因型为 VIId 亚型, 研制和使用 VIId 亚型 ND 疫苗对我国 ND 的控制将具有重要的现实意义, 为此, 扬州大学利用反向遗传技术从近 10 年来分离的 NDV 强毒中筛选出遗传稳定、生物学特性优良的基因 VIId 亚型毒株作为母本毒株, 成功研制出了基因 VII 型 NDV 致弱株 A-VII^[46], 其毒力符合弱毒株的标准, 且该毒株在鸡胚中具有较强的繁殖性能。该毒株灭活疫苗的临床试验数据显示, 与疫苗株 LaSota 相比, 该疫苗不仅能有效降低流行株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; 同时, 该灭活疫苗诱导抗体产生的速度显著快于常规疫苗株 LaSota, 且免疫后诱导产生的 HI 抗体较 LaSota 高 2 个滴度。该疫苗可有效预防我国 NDV 流行株的感染, 能有效控制免疫鸡群中的非典型 ND, 同时也是第一个可用于鹅 ND 预防的疫苗。重组新城疫病毒灭活疫苗(A~VII 株)于 2014 年成功获得了国家一类新兽药证书, 该疫苗毒株与当前我国禽群中流行毒株的基因型完全一致, 因此, 该疫苗的使用, 在控制我国新城疫的流行中显示出了广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol*, 2001, 30: 439-55
- [2] Chong YL, Padhi A, Hudson PJ, et al. The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000872
- [3] Miller PJ, Kim LM, Ip HS, et al. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology*, 2009, 391: 64-72
- [4] 巩艳艳, 崔治中. 细胞培养上新城疫病毒 HN 基因在抗体免疫选择压作用下的抗原表位变异. *中国科学: C 辑*, 2009, 39: 1175-80
- [5] Gu M, Liu W, Xu L, et al. Positive selection in the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus and its effect on vaccine efficacy. *Virology*, 2011, 8: 150
- [6] Chare ER, Gould EA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2691-703
- [7] Yin Y, Cortey M, Zhang Y, Cui S, et al. Molecular characterization of Newcastle disease viruses in Ostriches (*Struthio camelus* L.): further evidences of recombination within avian paramyxovirus type 1. *Vet Microbiol*, 2011, 149: 324-9
- [8] Zhang R, Wang X, Su J, et al. Isolation and analysis of two naturally-occurring multi-recombination Newcastle disease viruses in China. *Virus Res*, 2010, 151: 45-53
- [9] Zhang R, Pu J, Su J, et al. Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001--2009. *Vet Microbiol*, 2010, 141: 246-57
- [10] Tan LT, Xu HY, Wang YL, et al. Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 750-3
- [11] Qin ZM, Tan LT, Xu HY, et al. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 601-11
- [12] Han GZ, He CQ, Ding NZ, et al. Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology*, 2008, 371: 54-60
- [13] Afonso CL. Not so fast on recombination analysis of Newcastle disease virus. *J Virol*, 2008, 82: 9303
- [14] Song Q, Cao Y, Li Q, et al. Artificial recombination may influence the evolutionary analysis of Newcastle disease virus. *J Virol*, 2011, 85: 10409-14
- [15] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol*, 2003, 148: 1387-403
- [16] Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res*, 2006, 120: 36-48
- [17] Huang Y, Wan HQ, Liu HQ, et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Brief Report. Arch Virol*, 2004, 149: 1445-57
- [18] Qiu X, Sun Q, Wu S, et al. Entire genome sequence analysis of genotype IX Newcastle disease viruses reveals

- their early-genotype phylogenetic position and recent-genotype genome size. *Virology*, 2011, 8: 117
- [19] Kim SH, Nayak S, Paldurai A, et al. Complete genome sequence of a novel Newcastle disease virus strain isolated from a chicken in West Africa. *J Virol*, 2012, 86: 11394-5
- [20] Kim LM, King DJ, Curry PE, et al. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol*, 2007, 81: 12641-53
- [21] Wan H, Chen L, Wu L, et al. Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol*, 2004, 33: 216-21
- [22] Wang Y, Duan Z, Hu S, et al. Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIIId isolated from chickens and geese. *Virology*, 2012, 9: 197
- [23] Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, et al. Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J Gen Virol*, 2009, 90: 2746-50
- [24] Chong YL, Lam TT, Kim O, et al. Successful establishment and global dispersal of genotype VI avian paramyxovirus serotype 1 after cross species transmission. *Infect Genet Evol*, 2013, 17: 260-8
- [25] 金扩世, 金宁一, 袁书智, 等. 猪副粘病毒的分离. *中国兽医学报*, 2001, 4: 323
- [26] 程龙飞, 柯美峰, 郑腾, 等. 猪源新城疫病毒的分离鉴定. *中国兽医科技*, 2004, 34: 66-8
- [27] Goebel SJ, Taylor J, Barr BC, et al. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J Virol*, 2007, 81: 12709-14
- [28] Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, et al. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res*, 2001, 77: 51-60
- [29] Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol*, 1993, 128: 363-70
- [30] Yu SQ, Kishida N, Ito H et al. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology*, 2002, 301: 206-11
- [31] 仇旭升, 孙庆, 姚春峰, 等. 两株基因III型强毒新城疫的全基因组测序及其与I系疫苗的亲缘性分析. *微生物学报*, 2009, 49: 302-8
- [32] Perozo F, Merino R, Afonso CL, et al. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis*, 2008, 52: 472-9
- [33] Hu Z, Hu J, Hu S, et al. Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIIId Newcastle disease virus. *Virology*, 2012, 9: 208
- [34] Susta L, Miller PJ, Afonso CL, et al. Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol*, 2011, 48: 349-60
- [35] Ecco R, Brown C, Susta L, et al. *In vivo* transcriptional cytokine responses and association with clinical and pathological outcomes in chickens infected with different Newcastle disease virus isolates using formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011, 141: 221-9
- [36] Russell PH, Alexander DJ. Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 1983, 75: 243-53
- [37] 徐秀龙, 刘秀梵. 抗鸡新城疫病毒单克隆抗体及所测定的毒株的抗原差异. *病毒学报*, 1988, 4: 39-44
- [38] Tsai HJ, Chang KH, Tseng CH, et al. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet Microbiol*, 2004, 104: 19-30
- [39] Lin MY, Liu HJ, Ke GM. Genetic and antigenic analysis of Newcastle disease viruses from recent outbreaks in Taiwan. *Avian Pathol*, 2003, 32: 345-50
- [40] Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, et al. Variation of a Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 1541-4
- [41] Peeters BP, de Leeuw OS, Versteegen I, et al. Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 2001, 19: 1616-27
- [42] Iorio RM, Syddall RJ, Sheehan JP, et al. Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. *J Virol*, 1991, 65: 4999-5006
- [43] Hu S, Wang T, Liu Y, et al. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Vet Microbiol*, 2010, 140: 92-7
- [44] Cattoli G, Fusaro A, Monne I, et al. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa--implications for diagnosis and control. *Vet Microbiol*, 2010, 142: 168-76
- [45] Miller PJ, King DJ, Afonso CL, et al. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, 2007, 25: 7238-46
- [46] Hu S, Ma H, Wu Y, et al. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*, 2009, 27: 904-10