

## 研究报告

## 中国禽源新城疫病毒(NDV)流行株 F 和 HN 基因的遗传演化和变异频率

徐怀英<sup>1</sup> 黄迪海<sup>2</sup> 张伟<sup>1</sup> 秦春芝<sup>2</sup> 刘星丽<sup>3</sup> 王友令<sup>1</sup> 欧阳文军<sup>1</sup> 秦卓明<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 山东农业科学院家禽研究所 山东 济南 250023)

(2. 山东省健牧生物药业有限公司 山东 济南 250100)

(3. 山东师范大学 山东 济南 250014)

**摘要:**【目的】新城疫(ND)是中国流行最严重的疫病之一,对家禽业可造成巨大的经济损失,疫苗防控是控制 ND 的重要措施。新城疫病毒(NDV)流行株的遗传演化一直是研究 NDV 的焦点。本文利用分子信息学手段,通过比较近 20 年间 NDV 流行株不同基因型 F 和 HN 基因的分子特征和遗传变异频率,解析免疫压力下 NDV 的演化规律。【方法】利用 Lasergene 7.1 和 MEGA 5.1 软件,选取本实验室 89 株 NDV 分离株,结合从 GenBank 下载的 364 株 NDV 流行株以及 15 株 NDV 经典毒株的基因序列,对其进行系统发育、分子特征和替代频率分析。【结果】系统发育表明,NDV 已经演化为 15 个基因型。一致性比较显示,NDV 流行株相同基因型之间核苷酸(氨基酸)高度同源,而不同基因型之间差异较大且存在明显的氨基酸变异积累。NDV 基因型的分布与时间、地域密切相关,VII<sub>d</sub> 亚型为中国 NDV 优势流行株。为评估 NDV 变异的频率,以 Go/GD/QY/1997 株(中国较早发生的基因 VII 亚型)为参照,1997–2015 年间 NDV 的 F/HN 基因的年平均核苷酸(氨基酸)替代率为  $2.31 \times 10^{-3}$  ( $2.26 \times 10^{-3}$ )/ $3.37 \times 10^{-3}$  ( $2.35 \times 10^{-3}$ )。其中,1997–2001 年(未使用基因 VII 型疫苗) F/HN 基因核苷酸年平均替代率为  $4.72 \times 10^{-3}$ / $8.28 \times 10^{-3}$ ;2002–2015 年(疫苗使用后)为  $1.6 \times 10^{-3}$ / $1.84 \times 10^{-3}$ ,显示出基因 VII 型疫苗在控制 NDV 变异速度方面具有明显的效果。【结论】生物信息学分析证实:研制出与 NDV 流行毒株相匹配的新型疫苗是控制当前 NDV 变异的关键。

**关键词:** 新城疫病毒, F 基因, HN 基因, 遗传演化, 替代频率

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31372332); National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0500800); Achievement Development Program of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No. 2016CGPY01)

\*Corresponding author: Tel: 86-531-83178278; E-mail: qinzm1997@163.com

**Received:** June 13, 2017; **Accepted:** August 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 15, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31372332); 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500800); 山东省农业科学院成果培育项目(No. 2016CGPY01)

**通讯作者:** Tel: 86-531-83178278; E-mail: qinzm1997@163.com

**收稿日期:** 2017-06-13; **接受日期:** 2017-08-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-15

## Genetic evolution and substitutions frequency of F and HN gene of Newcastle disease virus isolates from poultry in China

XU Huai-Ying<sup>1</sup> HUANG Di-Hai<sup>2</sup> ZHANG Wei<sup>1</sup> QIN Chun-Zhi<sup>2</sup> LIU Xing-Li<sup>3</sup>  
WANG You-Ling<sup>1</sup> OUYANG Wen-Jun<sup>1</sup> QIN Zhuo-Ming<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan, Shandong 250023, China)

(2. Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan, Shandong 250100, China)

(3. Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China)

**Abstract:** [Objective] Newcastle disease virus (NDV) is one of the most serious infection problems in China in the last two decades, resulting in huge economic losses for the poultry industry. The genetic evolution of NDV strain is a very important topic for controlling ND. In this study, the evolution of NDV under the immune pressure of vaccine was further assessed by comparing the molecular characteristics and genetic variation frequency of F and HN genes of different genotypes of NDV. [Methods] NDV sequences of F gene and HN gene including 89 NDV isolates in our laboratory, 364 NDV pandemic strains worldwide and 15 classical strains, were collected and downloaded from the GenBank, and further genetically analyzed to determine their evolution, molecular characteristic and substitution rate by using Lasergene 7.1 and MEGA 5.1 software. [Results] Phylogenetic tree analysis suggested that NDV evolved into 15 distinct genotypes from genotype I to XV. Most NDV pandemic isolates during 1997–2015 belonged to sub-genotype VII d, suggesting that this genotype was the dominate isolate in China in the last two decades. Furthermore, comparison based on homologies of the nucleotide and amino acid sequence of F and HN gene of NDV showed that different genotypes had their own distinct characteristics, and significant accumulation of amino acid variation was also found. In addition, in comparing F and HN gene with reference Go/GD/QY/1997, which was the first genotype VII in China, average annual substitution frequencies of NDV pandemic strain nucleotide (amino acid) were  $2.31 \times 10^{-3}$  ( $2.26 \times 10^{-3}$ ) and  $3.37 \times 10^{-3}$  ( $2.35 \times 10^{-3}$ ), respectively. Substitution rates of F and HN during 1997–2001 were  $4.72 \times 10^{-3}$  and  $8.28 \times 10^{-3}$ , higher than that during 2002–2015 ( $1.6 \times 10^{-3}$  and  $1.84 \times 10^{-3}$ ), when the genotype VII vaccine was initially applied in the field. [Conclusion] Bioinformatics analysis proved that matching NDV vaccine strain with epidemic strains in genotype is an important factor in mitigating NDV variability.

**Keywords:** NDV, F gene, HN gene, Evolution, Substitution frequency

新城疫(Newcastle disease, ND)主要是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的家禽、野鸟等感染的一种烈性传染病,是危害中国乃至全世界养禽业最重要的疫病之一<sup>[1-2]</sup>。自1926年首次在英国发现以来,该病已在世界范围内流行近90年,给全球家禽和野生鸟类造成了严重危害,带来了巨大的经济损失。

NDV是一种具有囊膜的单股、负链、不分节段的RNA病毒。依据其基因组大小,初步分为Class I和Class II两大类。Class I主要源自水禽,由15 198个核苷酸组成,主要为弱毒。Class II由15 186和15 192两类核苷酸组成,除基因I型和部

分基因II型为弱毒外,大部分为强毒。NDV基因组包含6个基因,分别编码3'NP-P-M-F-HN-L5'六种结构蛋白和两种非结构蛋白<sup>[3]</sup>。NDV的囊膜由F和HN两个糖蛋白组成,F糖蛋白能够融合宿主细胞膜,使病毒侵入宿主细胞内;HN糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶活性,在病毒侵染过程中识别细胞受体,介导病毒吸附细胞膜,是极其重要的保护性抗原,这两种蛋白决定着NDV的抗原性(包括毒力等)和免疫原性<sup>[4-5]</sup>。

为探讨近20年来中国NDV分子遗传变异的趋势,课题组在总结前期研究的基础上,结合已在GenBank登录的国内外364株NDV序列,并以最

早在国内发生的 VII 型 Go/GD/QY/1997 (简写“QY97”)为参考毒株,从 F 和 HN 基因的核苷酸和氨基酸水平上分析比较其替代频率,旨在进一步探讨 NDV 的遗传变异规律,为 NDV 的合理防控提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 NDV 基因序列来源

本课题组 1997–2015 年期间分离、鉴定并测序的 89 株 NDV 流行毒株的基因序列,以及从 GenBank 下载的 364 株具有代表性的国内外禽源 NDV 流行毒株和 15 株国内外经典毒株序列。

### 1.2 方法

(1) 利用 Lasergene 7.1 和 MEGA 5.1 软件对 NDV 毒株的 F 和 HN 基因核苷酸(nt)和氨基酸(aa)序列进行比对,利用 F 和 HN 基因 nt 序列全长绘制系统发育树,参照 Diel 等方法进行基因分型<sup>[6]</sup>。

(2) 参照文献[7-8]的方法,利用 MEGA 5.1 软件,比较 NDV 流行株不同基因型的 F 和 HN 基因的核苷酸(氨基酸)替代频率。同时,以国内最早发生的 VII 型 QY97 为参考(GenBank 登录号为 KJ782375),重点评价了 1997–2015 年在我国广泛流行的 VII 型 NDV 流行株的替代频率,并对其关键氨基酸位点进行分析,进而探讨其分子变异机制。

## 2 结果与分析

### 2.1 系统发育树的构建

利用 NDV F 和 HN 基因全长核苷酸(nt)序列绘制系统进化树,二者的绘制结果基本一致。图 1 显示的是依据 F 基因 nt 全长绘制的系统发育树。依据 Diel 等<sup>[6]</sup>的标准,初步将 NDV 毒株分为 15 个基因型(图 1)。本实验室分离的 89 株 NDV 流行株主要分布于基因 II 型(8 株)、VI 型(6 株)、VII 型(71 株)和 IX 型(4 株)。其中,基因 VII 型进一步演化为不同的亚型(图 1),而 VII d 型多达 67 株(占 VII 型的 94.4%),这表明 VII d 亚型不仅是 VII 型中的优势株,也是我国 NDV 流行株中的优势株。

国外 NDV 流行株主要分布于 X 型、XI 型和 XIII 型,与中国 NDV 流行株明显不同,具体分布

如下:基因 X 型(3 株,源自北美洲的美国)、XI 型(3 株,源自非洲的马达加斯加)和 XIII 型(4 株,源自南亚的巴基斯坦)。

比较发现:NDV 流行株基因型的分布与地域、时间密切相关。不同时间、不同国家和地区,其基因型不同,具有地域性特点,显示出 NDV 遗传演化的多样性和复杂性。

### 2.2 相似性比较

NDV F 和 HN 基因相似性比较显示:同一基因型内核苷酸(nt)相似性较高(表 1)。以 HN 基因为例:基因 VII 型毒株间 nt 相似性为 92.1%–99.9%;基因 II 型毒株间为 95.6%–100%;基因 I 型毒株间为 93.1%–100%;基因 III 型毒株间为 99.3%–99.9%;基因 IX 毒株间为 99.4%–99.9%;基因 VI 型毒株间为 91.4%–100%。相反,不同基因型间差异较大,如 La Sota 与基因 VII 型毒株之间 nt/aa 相似性为 78.1%–80.1%;与基因 IX 型相似性为 86.8%–87.4%;与基因 VI 型相似性为 79.9%–81.2%。F 和 HN 基因 nt 相似性结果一致。

### 2.3 F 和 HN 遗传变异及其与年代的相关性

**2.3.1 NDV 流行株与经典疫苗株的核酸差异比较:**以经典疫苗 La Sota 株的 F 基因核苷酸序列为参照,与不同基因型的 NDV 流行株相比较,以其差异率为纵坐标,以年代为横坐标,构建核苷酸差异率随年代变化的散点图。如图 2 所示:1997 年以前,NDV 流行株主要以 IX 型为主,发病比例不高,但流行历史较长,贯穿始终,至今仍有少量发生;VII 型 NDV 是 1997 年后新出现的毒株,特别是自 2001 年以后,该型成为中国的优势流行株,图 2 较好地显示了这一切;基因 II 型、III 型、VIII 和 VI 型等数量相对较少;基因 VIII 仅在 1979 和 1985 年出现;III 型最早发生在 1930 年,此后在 1995–2005 年出现,目前分离株较少;基因 VI 型是仅次于 VII 型的 NDV 毒株,是 1972 年以后新出现的毒株,主要危害鸽类。由图 2 可见,NDV 基因 VII 型流行株与 La Sota 的差异呈明显的上升趋势。

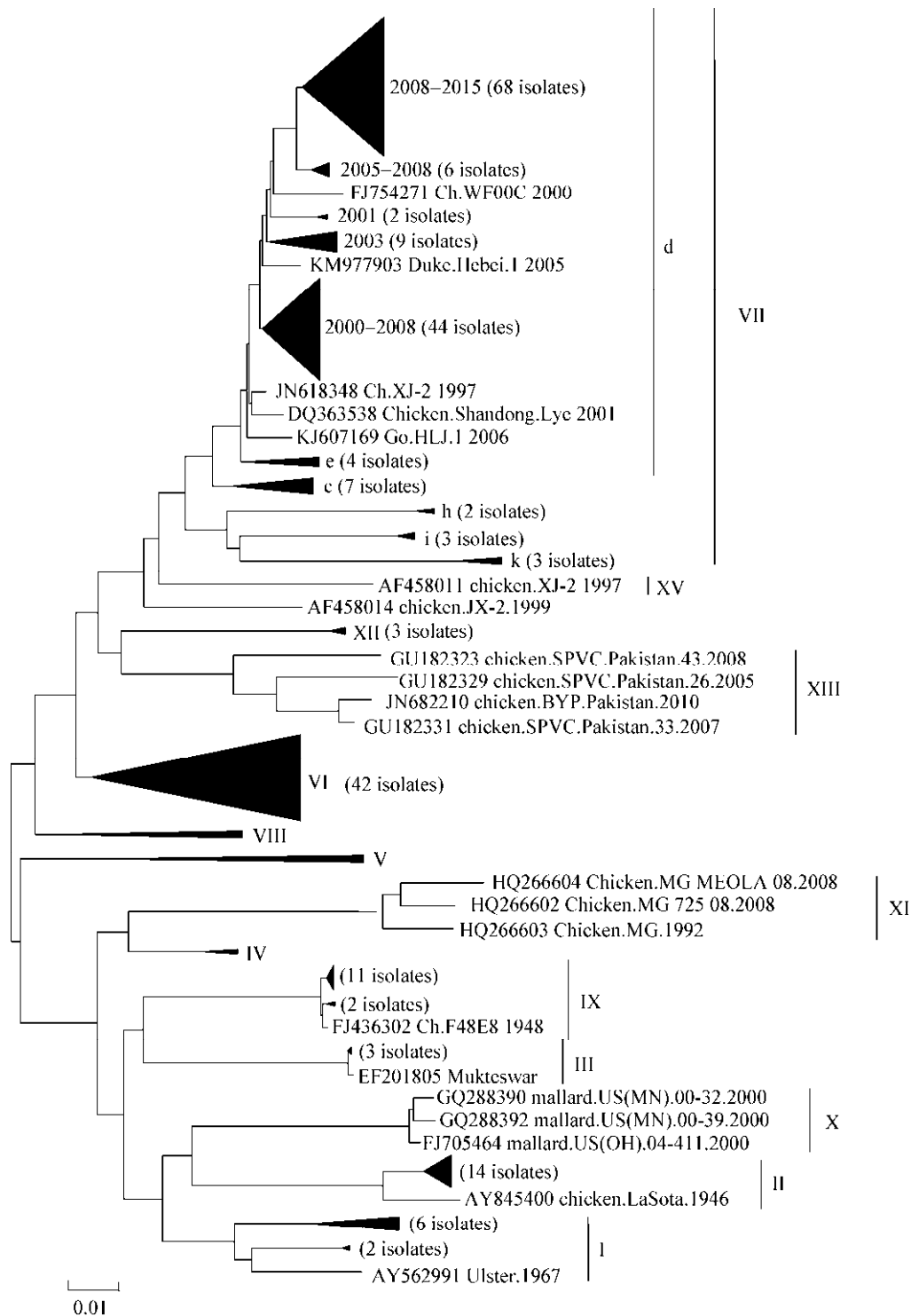


图 1 中国 1997–2015 年新城疫流行株 F 基因系统发育树

Figure 1 F gene phylogenetic tree of NDV strains from 1997 to 2015 in China

注: GenBank 号列于 NDV 毒株名称之前; ◀: 表示含 2 个以上毒株; 括号中的数字表示毒株数量; 标尺刻度代表序列差异。

Note: GenBank accession number were listed before the names of NDV. ◀: More than two strains; The numbers in brackets indicate NDV isolates; The scale bar means sequence difference.

表 1 不同基因型 NDV F 和 HN 基因核苷酸平均替代率的比较  
Table 1 Comparison with different NDV genotypes average nucleotide substitution per cite per year in F and HN gene

基因型 Genotype	年代 Year	F 基因 F gene			HN 基因 HN gene		
		毒株数量 Number of strains	基因型内的同源性 Homology in the same genotype (%)	平均替代率 Average substitution rate ( $\times 10^{-3}$ )	毒株数量 Number of strains	基因型内的同源性 Homology in the same genotype (%)	平均替代率 Average substitution rate ( $\times 10^{-3}$ )
I	1967–2014	23	95.5–99.9	1.01	23	93.1–100	0.97
II	1946–2015	23	96.3–99.6	0.07	17	95.6–100	0.08
III	1950–2009	8	96.0–100	0.02	6	99.3–99.9	0.07
IX	1948–2014	25	98.9–99.8	0.02	12	99.4–99.9	0.06
VI	1972–2015	62	92.7–100	2.22	47	91.4–100	1.82
VII	1997–2015	327	93.3–99.9	2.26	274	92.1–99.9	3.23

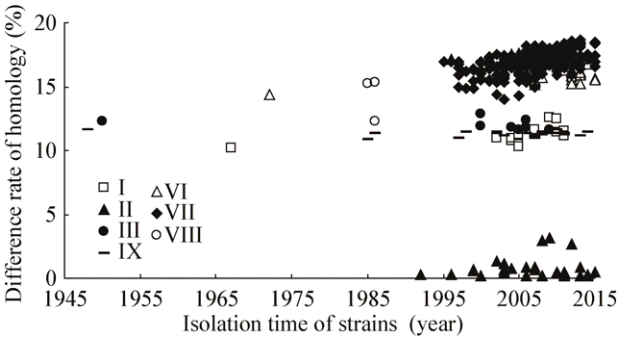


图 2 NDV 流行株与 La Sota 株 F 基因的核苷酸差异及其与年代的相关性  
Figure 2 The relationship between F gene nt homologies of NDV epidemic strains against La Sota in different years

2.3.2 不同基因型 NDV 的核苷酸年平均替代率的比较: 利用 MEGA 5.1 软件对 NDV 不同基因型的 F 和 HN 基因进行核苷酸替代的比较, 结果见表 1。在所有基因型中, 以基因 VII 替代率最高, 基因 VI 次之, 基因 II、III、IX 等相对较低, F 和 HN 的结果类似。但在基因 VII NDV 流行株中, HN 基因的替代率明显高于 F 基因。

2.3.3 NDV 基因 VII 型的年平均核苷酸/氨基酸进化率: (1) 核苷酸替代率比较: 基因 VII 是我国 NDV 的优势流行株, 以国内最早发生的 QY97 (基因 VII) 为参照, 不同年代的 NDV 基因 VII 流行株与其进

行核苷酸替代比较, 结果见表 2 和表 3。由表 2 可见: NDV 流行株 F 基因 1997–2015 年的年平均核苷酸替代率为  $2.31 \times 10^{-3}$ 。其中, 1997–2001 年(未使用基因 VII 型疫苗) F 基因年平均核苷酸替代率为  $4.72 \times 10^{-3}$ ; 2002–2015 年(疫苗使用后)为  $1.6 \times 10^{-3}$ , 显示出基因 VII 型疫苗在控制 NDV 变异速度方面具有明显的效果。

由表 3 可见: 1997–2015 年间, NDV 流行株 HN 基因的年平均核苷酸替代率为  $3.37 \times 10^{-3}$ 。其中, 1997–2001 年(未使用基因 VII 型疫苗) HN 基因的年平均核苷酸替代率为  $8.28 \times 10^{-3}$ ; 2002–2015 年(疫苗使用后)为  $1.84 \times 10^{-3}$ 。

(2) 氨基酸替代率比较: 参照上述方法, 对近 20 年的 NDV 基因 VII 流行株氨基酸替代率进行比较。结果发现 F 基因在 1997–2015 年间的年平均氨基酸替代率为  $1.14 \times 10^{-3}$ 。其中, 1997–2001 年间的替代率为  $3.86 \times 10^{-3}$ , 而在 2002–2015 年间的替代率仅为  $0.31 \times 10^{-3}$ 。HN 基因在 1997–2015 年间的年平均氨基酸替代率为  $2.35 \times 10^{-3}$ 。其中, 1997–2001 年间的替代率为  $5.86 \times 10^{-3}$ , 而 2002–2015 年间的替代率仅为  $1.49 \times 10^{-3}$ 。

综合比较显示: HN 基因的年平均替代率略高于 F, 显示出二者具有相同的进化规律。

表 2 1997–2015 年我国 NDV 基因 VII 型毒株 F 基因每年每位点核苷酸替代率  
Table 2 Genotype VII F gene of NDV average nucleotide substitution per cite per year from 1997 to 2015 in China

阶段 Period	年代 Year	毒株数量 Number of strains	基因长度 Length (nt)	变异数量 Number of variation	变异率 Variation rate (%)	转换数 P	颠换数 Q	替代率 Substitution rate (%)	平均替代率 Average substitution rate ( $\times 10^{-3}$ )
未使用基因 VII 型疫苗 Unused genotype VII vaccine	1997	1	1 662	0	0	0	0	0	4.72*
	1998	1	1 662	40.0	2.41	38.0	2.0	2.53	
	1999	2	1 662	75.0	4.51	69.5	5.5	4.90	
	2000	5	1 662	39.4	2.37	35.6	3.8	2.54	
	2001	6	1 662	36.5	2.20	32.8	3.7	2.36	
使用基因 VII 型疫苗 Using genotype VII vaccine	2002	6	1 662	34.3	2.06	29.5	3.8	2.16	1.60
	2003	23	1 662	46.2	2.78	41.5	4.7	3.00	
	2004	6	1 662	39.5	2.38	34.5	5.0	2.59	
	2005	16	1 662	42.5	2.56	38.0	4.5	2.76	
	2006	33	1 662	47.5	2.86	42.4	5.1	3.10	
	2007	42	1 662	51.9	3.12	46.2	5.7	3.40	
	2008	47	1 662	53.5	3.22	48.0	5.5	3.50	
	2009	20	1 662	56.8	3.42	51.6	5.2	3.70	
	2010	20	1 662	62.8	3.78	56.6	6.2	4.11	
	2011	45	1 662	63.7	3.83	57.6	6.1	4.17	
	2012	17	1 662	67.2	4.04	61.1	6.1	4.40	
	2013	12	1 662	64.4	3.87	58.2	6.2	4.22	
	2014	4	1 662	59.0	3.55	53.0	6.0	3.86	
	2015	5	1 662	67.1	4.04	60.8	6.3	4.40	

注：\*：与 2002–2015 年 NDV 分离株差异显著( $P<0.01$ )。

Note：\*：Highly significant difference comparing NDV isolates in 2002–2015 with separate periods ( $P<0.01$ ).

表 3 1997–2015 年我国 NDV 基因 VII 型毒株 HN 基因每年每位点核苷酸替代率  
Table 3 Genotype VII HN gene of NDV average nucleotide substitution per cite per year from 1997 to 2015 in China

阶段 Period	年代 Year	毒株数量 Number of strains	基因长度 Length (nt)	变异数量 Number of variation	变异率 Variation rate (%)	转换数 P	颠换数 Q	替代率 Substitution rate (%)	平均替代率 Average substitution rate ( $\times 10^{-3}$ )
未使用基因 VII 型疫苗 Unused genotype VII vaccine	1997	1	1 716	0.0	0.00	0.0	0.0	0.00	8.20*
	1998	1	1 716	8.0	3.08	7.0	1.0	0.50	
	1999	3	1 716	52.7	3.00	48.0	4.7	3.30	
	2000	9	1 716	51.4	3.78	45.2	6.2	3.26	
	2001	8	1 716	64.7	3.53	58.6	6.1	4.13	
使用基因 VII 型疫苗 Using genotype VII vaccine	2002	9	1 716	60.5	4.01	53.5	7.0	3.83	1.84
	2003	22	1 716	68.7	4.37	61.1	7.6	4.38	
	2004	11	1 716	69.5	4.38	62.7	6.8	4.44	
	2005	14	1 716	74.9	4.67	66.5	8.4	4.85	
	2006	20	1 716	75.0	4.43	66.5	8.5	4.79	
	2007	24	1 716	80.0	4.65	71.2	8.8	5.14	
	2008	37	1 716	75.9	4.43	67.7	8.2	4.89	
	2009	11	1 716	79.6	4.65	71.0	8.6	5.14	
	2010	9	1 716	83.0	4.45	74.0	9.0	5.35	
	2011	29	1 716	90.5	5.29	79.6	10.9	5.92	
	2012	19	1 716	92.6	5.41	83.0	9.6	5.99	
	2013	11	1 716	96.6	5.64	86.2	10.4	6.26	
	2014	2	1 716	75.5	4.41	65.5	10.0	4.87	
	2015	2	1 716	98.5	5.57	88.0	10.5	6.41	

注：\*：与 2002–2015 年 NDV 分离株差异显著( $P<0.01$ )。

Note：\*：Highly significant difference comparing NDV isolates in 2002–2015 with separate periods ( $P<0.01$ ).

## 2.4 NDV 基因 VII 型的关键氨基酸位点分析

通过对 71 株国内 NDV 基因 VII 型的氨基酸基序和系统发育比较发现, NDV 基因 VII 型流行毒病还可以进一步分为不同的基因亚型, 该结果已在多篇文献中描述<sup>[9-10]</sup>。本研究证实, 基因 VII d 亚型不仅为优势流行株, 还具有其它亚型所不具备的氨基酸位点, 如 71R、474I 和 500A 等; 同时, F 蛋白出现了较多的氨基酸替代, 即 78K→R、145N→K、279Q→H、387K→R、480K→R、513V→I 和 520G→A, 其中除 4 个氨基酸为保守性替换外, 其它 3 个氨基酸的改变涉及到极性所带电荷的变化, 而且具有氨基酸变异的累积。

HN 基因与 F 基因相似, 也出现了多个特异性的氨基酸替代位点, 如 45V→A、48T→M、49T→E、102T→V、118A→E、120N→S、129D→G、310D→G、362G→A、347E→K、443T→M、479H→Y 和 540V→A 等。

## 3 讨论

### 3.1 NDV 基因型的多样性和复杂性

中国是一个养禽大国, 免疫接种是防控 ND 的基本国策, 通过疫苗的推广应用, 我国已经把 ND 控制到比较低的水平。尽管如此, 中国依然是世界上 NDV

流行较为严重的国家。近期的第四次 NDV 世界大流行无论在疫病流行的规模、速度、宿主的种类、危害程度及持续时间上, 均超过了前三次<sup>[11-13]</sup>。目前, 中国 NDV 流行株主要包含基因 II、VI、VII、IX、XII 和 XV 型<sup>[6-13]</sup>, 是世界上 NDV 基因型存在较多的国家之一, 这无疑对我国的 NDV 防控提出了新的挑战。

基因分型是在 NDV 分类中应用最广泛、最便捷和最准确的方法, 因为它建立在对病原分子序列分析的基础上, 不同基因型之间的进化距离和系统发育存在着更为精准的相关性。研究者在参照国际公认的禽流感基因型划分标准的同时, 对 NDV 提出了更为合理的分型依据, 初步确定了 NDV 不同基因型间的平均进化距离(10%), 并把其作为鉴定新基因型的标准<sup>[6]</sup>。依据新的分类方法, Class I 病毒由单一基因型组成, 而 Class II 则由 18 个基因型组成(本实验有 15 个基因型), 包括先前确定的 10 个(I-IX 和 XI)基因型和 8 个新基因型(X、XII-XVIII)<sup>[14-16]</sup>, 新基因型大都来自北美洲、非洲和欧洲, 但 XII 和 XV 源自中国。图 3 显示了不同时间的 NDV 进化和新基因型出现的时间, 显示出在一定的免疫压力下, 点突变、不同宿主种间传播、气候、地域等因素共同促进了 NDV 的演化。

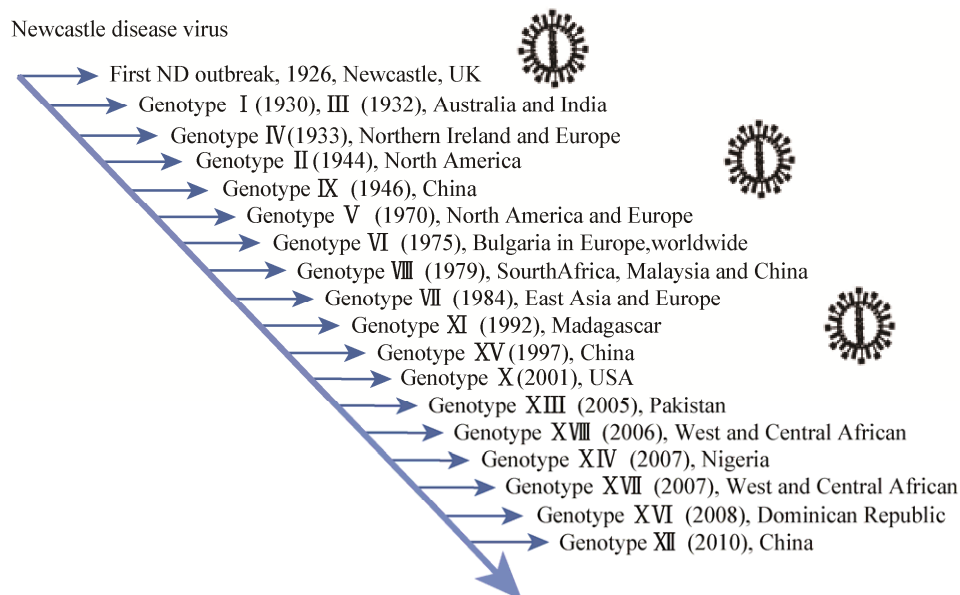


图 3 新城疫病毒不同年代基因型的演化历史

Figure 3 Evolutionary history of different genotypes of Newcastle disease virus in different years

### 3.2 NDV 变异频率的探讨

遗传和变异是病毒适应外界环境并维持生存的一种重要方式,也是病毒逃避和抵抗宿主疫苗免疫的重要手段。NDV 属于 RNA 病毒,单股、负链、不分阶段,其复制酶缺乏校正机制,因此,NDV 的变异频率相对于 DNA 病毒较高<sup>[17]</sup>。NDV 不同基因型之间,其遗传变异速率不一,以基因 VI 型和 VII 型变异频率最大,而其它基因型则相对较小。该 F 基因变异频率结果与 Lee 等的研究相近(年核苷酸变异频率为  $2.89 \times 10^{-3}$ )<sup>[18]</sup>。进一步的研究表明,1997–2001 年 NDV 基因 VII 型最早出现时,其 HN 基因核苷酸年平均进化率明显比 F 基因高,这暗示着对 NDV 抗原性影响较大的 HN 基因则必然会影 响疫苗的免疫效果。部分养殖场为提高疫苗的保护效果,陆续接种了基因 VII 灭活疫苗,因此在 2002–2015 年间,HN 基因核苷酸年平均替代率仅为  $1.84 \times 10^{-3}$ 。这表明,当流行株与疫苗株完全匹配时,可大大降低免疫鸡群的排毒量和载毒量,减少 NDV 变异的频率<sup>[19]</sup>。该结果与低致病性禽流感 H9N2 的变异十分相似。但对于多片段的禽流感病毒而言,H9N2 流行株 HA 基因的年均替代率明显高于 NDV 的 HN 变异频率<sup>[8]</sup>。

### 3.3 NDV 变异对于疫苗防控的启示

尽管 NDV 只有一个血清型,但其编码的基因型已进化到 18 个。这表明,NDV 在长期的免疫选择压力下正处于持续的进化之中。前期的研究表明,NDV 的 HN 基因和 F 基因同源性均与 HI 交叉抑制试验具有相关性,但主要与 HN 基因有关,这也在一定程度上证实了长期的点突变积累造成了 NDV 抗原性的变化<sup>[20]</sup>。

HN 蛋白是 NDV 囊膜上最大的纤突糖蛋白,在免疫反应中具有决定作用,是重要的保护性抗原。HN 蛋白结构呈  $\beta$  螺旋折叠,内有 4 股反向平行的 6 个  $\beta$  折叠区。相对应的氨基酸区域位点为:175–228 ( $\beta$ 1: 抗原对应位点 23)、237–288 ( $\beta$ 2: 抗原对应位点 3)、316–396 ( $\beta$ 3: 抗原对应位点 3、1、

4 和 14)、401–403 ( $\beta$ 4)、472–515 ( $\beta$ 5: 抗原对应位点 2)和 521–577C 末端( $\beta$ 6: 抗原对应位点 2)<sup>[21–22]</sup>。生物信息学分析发现,NDV 流行株的 HN 基因在上述氨基酸关键位点已经发生了改变,如 347 位为“E→K”、362 位“G→A”等,上述位点的改变均会对 NDV 的抗原性产生影响<sup>[23]</sup>。

新城疫在全球已流行近 90 年,疫苗预防在控制 ND 流行方面发挥了重要作用。但再完美的疫苗也不能阻挡 NDV 的遗传演变和替代,对病原的杀灭净化和生物安全措施应成为下一步疫病防控的重点。

### 参 考 文 献

- [1] Ma BC, He YF, Xu HY, et al. Isolation, identification and molecular characterization of a velogenic NDV isolate from a broiler flock in high antibody level against NDV[J]. Microbiology China, 2007, 34(1): 95-100 (in Chinese)  
马保臣, 何叶峰, 徐怀英, 等. 高抗体水平种鸡 NDV 的分离鉴定和分子特性[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 95-100
- [2] Wang YK, Tian HF, Zhou JH, et al. A primary study on the Geese's paramyxovirus infection[J]. China Poultry, 1998, 20(4): 3-5 (in Chinese)  
王永坤, 田慧芳, 周继宏, 等. 鹅副粘病毒病的研究[J]. 中国家禽, 1998, 20(4): 3-5
- [3] Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome[J]. Virus Research, 2006, 116(1/2): 168-184
- [4] de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, et al. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(6): 1759-1769
- [5] Jin JH, Zhao J, Ren YC, et al. Contribution of HN protein length diversity to Newcastle disease virus virulence, replication and biological activities[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36890
- [6] Diel DG, da Silva LH, Liu HL, et al. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2012, 12(8): 1770-1779
- [7] Du NX, Pan QQ, Zhang SF. The wrong idea of genetic distance and the exploration of the trace of virus evolution[J]. Virologica Sinica, 2005, 20(3): 335-339 (in Chinese)  
杜念兴, 潘芹芹, 张素芳. 遗传距离的错误观点和病毒进化踪迹的探索[J]. 中国病毒学, 2005, 20(3): 335-339
- [8] Meng F, Xu HY, Zhang W, et al. Genetic evolution and substitution frequency of avian influenza virus HA gene in chicken H9N2 subtype in China in the last 20 years[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 35-43 (in Chinese)



- 孟芳, 徐怀英, 张伟, 等. 近 20 年中国部分地区鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因遗传演化及其变异频率[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 35-43
- [9] Xu HY. Antigenicity and genetic variation of Newcastle disease virus isolated from Shandong Province[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
徐怀英. 新城疫病毒山东流行株分子演化及抗原性变异分析[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2014
- [10] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(2): 601-611
- [11] Hu ZL, Hu J, Hu SL, et al. High levels of virus replication and an intense inflammatory response contribute to the severe pathology in lymphoid tissues caused by Newcastle disease virus genotype VIId[J]. Archives of Virology, 2015, 160(3): 639-648
- [12] Liu XF, Hu SL. Molecular epidemiology of Newcastle disease virus and new vaccine development in China[J]. China Poultry, 2010, 32(21): 1-4 (in Chinese)  
刘秀梵, 胡顺林. 我国新城疫病毒的分子流行病学及新疫苗研制[J]. 中国家禽, 2010, 32(21): 1-4
- [13] Qin ZM, Xu HY, Liu YS, et al. Prevention and dynamic evolution of antigenic and core genes of Newcastle disease virus[J]. China Poultry, 2011, 33(14): 1-6 (in Chinese)  
秦卓明, 徐怀英, 刘玉山, 等. 新城疫病毒抗原性和核心基因的动态演化及防控思考[J]. 中国家禽, 2011, 33(14): 1-6
- [14] Khorajiya JH, Pandey S, Ghodasara PD, et al. Patho-epidemiological study on Genotype-XIII Newcastle disease virus infection in commercial vaccinated layer farms[J]. Veterinary World, 2015, 8(3): 372-381
- [15] Samuel A, Nayak B, Paldurai A, et al. Phylogenetic and pathotypic characterization of newcastle disease viruses circulating in west Africa and efficacy of a current vaccine[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(3): 771-781
- [16] Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, et al. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(7): 2250-2260
- [17] Dimitrov KM, Lee DH, Williams-Coplin D, et al. Newcastle disease viruses causing recent outbreaks worldwide show unexpectedly high genetic similarity to historical virulent isolates from the 1940s[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(5): 1228-1235
- [18] Lee EK, Jeon WJ, Kwon JH, et al. Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 134(3/4): 241-248
- [19] Hu SL, Sun Q, Wu YT, et al. Attenuation of a genotype VIId Newcastle disease virus ZJI strain of goose origin by reverse genetics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 197-200 (in Chinese)  
胡顺林, 孙庆, 吴艳涛, 等. 用反向遗传技术致弱基因 VIId 型鹅源新城疫病毒 ZJI 株[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 197-200
- [20] Qin ZM. Heterogeneities of pathogenicity and antigenicity in relation to the genetic variation of F and HN genes in prevailed Newcastle disease viruses[D]. Tai'an: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2006 (in Chinese)  
秦卓明. 新城疫病毒流行株致病性和抗原性及其与 F 和 HN 基因变异的相关性[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2006
- [21] Connaris H, Takimoto T, Russell R, et al. Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of newcastle disease virus: identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion[J]. Journal of Virology, 2002, 76(4): 1816-1824
- [22] McGinnes LW, Morrison TG. Inhibition of receptor binding stabilizes Newcastle disease virus HN and F protein-containing complexes[J]. Journal of Virology, 2006, 80(6): 2894-2903
- [23] Zhu J. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in Eastern China during 2008-2013 and the effect of E347K mutation in HN gene on antigenicity[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2015 (in Chinese)  
朱杰. 2008-2013 年华东地区新城疫病毒分子流行病学及 HN 基因 E347K 变异对病毒抗原性的影响[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2015