

10 株鸭源新城疫病毒的分离鉴定及 F 基因遗传进化分析

孙 杰, 刁有祥*, 李建侠, 吴焕荣, 颜 贇, 杨建朋, 李瑶瑶

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 为调查山东省鸭群中新城疫病毒(NDV)的流行情况, 对 2007—2009 年山东不同地区发病鸭群进行了 NDV 的分离鉴定, 并对分离的 10 株鸭源 NDV 进行了生物学特性和遗传特性研究。结果显示: 10 株鸭源 NDV 的致病指数 MDT 和 ICPI 测定结果分别为 50.4~60.0 和 1.66~1.78, 表明 10 株分离株均属强毒株。致病性试验显示, 3 株代表毒株对不同日龄雏鸭均具有较强的致病性, 发病率和死亡率分别达 70%~100% 和 20%~70%。对 F 基因序列分析表明, 相对于基因 I~VI 型 NDV, 10 株鸭源 NDV F 蛋白存在较大变异, 这些变异主要集中在 1—30、101—124、479—494 和 509—516 aa 处, 且在 52、71、176、272、314、402 和 489 位出现了与近几年流行毒株一致的氨基酸替代。核苷酸同源性分析结果表明, 10 株鸭源 NDV 之间同源性在 95.8%~99.9%, 与 2000 年以来国内外分离的基因 VII 型 NDV 同源性较高, 在 95.7%~99.8%, 与传统 LaSota、F48E9 同源性较低, 为 83.8%~90.9%。遗传进化分析结果显示分离毒株均属于基因 VII d 型。此外, 10 株鸭源 NDV 还具有大多数鹅源 NDV 所特有的 973 位和 1 249 位 *Rsa* I 位点。上述结果表明基因 VII d 型 NDV 是造成我国鸭群近年来发生新城疫的主要病原, 鸭源 NDV 很可能源于早期的鹅源 NDV。

关键词: 鸭; 新城疫; F 基因; 遗传特性

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)08-1054-07

Identification and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated from Duck Flocks

SUN Jie, DIAO You-xiang*, LI Jian-xia, WU Huan-rong,

YAN Yun, YANG Jian-peng, LI Yao-yao

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong

Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: To explore the epidemiological understanding of Newcastle disease virus (NDV) in ducks, 10 NDVs isolated from outbreaks in duck flocks in Shandong Province during 2007—2009 were characterized both biologically and genetically. All 10 strains were velogenic strains based on their MDT (50.4-60.0) and ICPI (1.66-1.78). Ducklings challenged with the strains showed visible clinical symptoms and autopsy changes, and the morbidity and mortality were up to 70%-100% and 20%-70%, respectively. Compared with genotype I-VI NDV, great variation were occurred, especially at 1-30aa, 101-124aa, 479-494aa and 509-516aa of F protein of the 10 isolates, which displayed the same characteristic amino acid substitutions at position 52, 71, 176, 272, 314, 402 and 489 with NDV strains obtained in recent years. Nucleotide analysis revealed that the homology among the 10 isolates was 95.8%-99.9%, and shared 95.7%-99.8% identities with genotype VII NDV since 2000, but only 83.8%-90.9% identities with LaSota and F48E9.

收稿日期: 2010-02-04

基金项目: 山东省科技攻关项目(2007GG30009001)

作者简介: 孙 杰(1986-), 女, 山东济宁人, 硕士生, 主要从事禽病学研究, E-mail: sunjie0206@126.com

* 通讯作者: 刁有祥, Tel: 0538-8242593 转 8009, E-mail: yxdiao@163.com

Phylogenetic analysis showed that all the 10 isolates were of the genotype VII d virus and had two *Rsa* I sites at position 973 and 1 249 bp which were characteristic to most strains of goose origin. The results indicated that the strains of genotype VII d NDV had been the major pathogen responsible for the most epizootic ND outbreaks in duck flocks in China, and NDV isolated from ducks was likely originated from that of goose flocks.

Key words: duck; Newcastle disease virus; *F* gene; genetical characterization

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的以感染禽类为主的一种急性、烈性传染病,是世界动物卫生组织(OIE)规定的法定报告疫病。NDV 属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)、腮腺炎病毒属(Avulavirus),其感染宿主范围广泛,迄今已知能自然或人工感染的鸟类超过 250 种^[1]。曾一度认为水禽对 NDV 易感性较低,很少或不表现临床症状,多呈隐性感染^[2]。1997 年,王永坤等从患病鹅体内分离到 NDV 强毒株,打破了 NDV 不对水禽致病之说^[3]。近年来,鸭群发生新城疫(亦被称为“鸭副黏病毒病”或“鸭副黏病毒感染”)在中国多个省区有报道,且呈上升趋势,对养鸭业造成严重经济损失。为探明鸭新城疫的流行情况,作者对山东省部分地区发病鸭群进行了新城疫病毒的分离鉴定,对分离毒株进行了生物学特性和致病性研究,并对分离毒株 *F* 基因进行了克隆和序列分析,旨在从分子水平上阐明各毒株间的亲缘关系及变异特点,为该病的预防和控制提供理论依据。

表 1 引物序列及所在基因组位置

Table 1 Sequence and genome location of the oligonucleotides

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	位置 Position	扩增片段大小/bp Product size
F1	ACT/CTGCGGAGC/TGTGAAAGTC	1—20	
R1	GTCGCAAGAGGAGTGAGCAG/AAGT	561—584	584
F2	TCCCG/AAATATACCCAT/GG/AGAT	490—509	
R2	A/GGTTTTGCGATATGATACCAGGAG	1 504—1 527	1 038
F3	T/CTCCCATGTCCCCAGGTATTTAT	1 350—1 373	
R3	ACC/TCGTGTATTGT/CTCTTTA/GGTTGC	2 053—2 076	727

物大小 2 076 bp,包括完整的 *F* 基因阅读框,由上海 Sangon 公司合成。

1.4 病毒的分离、鉴定及纯化

按照 OIE 推荐方法进行病毒的分离鉴定,参照文献[4]的方法对分离毒株进行蚀斑纯化。

1.5 致病指数测定

按常规方法^[5]对病毒分离株进行鸡胚平均致死时间(MDT)、1 日龄雏鸡脑内接种致病指数(ICPI)

1 材料与方法

1.1 病料与实验动物

病料采自 2007—2009 年山东省部分地区表现类似 NDV 感染的发病鸭群。

SPF 鸡、鸡胚购自山东省农业科学院家禽研究所,健康雏鸭购自山东省泰安市某种鸭场。

1.2 主要试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司;M-MLV、Ribonuclease Inhibitor、*Taq* DNA Polymerase、pMD18-T Vector、限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自上海 Sangon 公司;AIV(H5、H7、H9 亚型)标准阳性血清、NDV 标准阳性血清、EDS-76 血清购自哈尔滨兽医研究所。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中发表的鸭 NDV *F* 基因核苷酸序列,设计合成 3 对特异性引物(表 1),预计扩增产

的测定。

1.6 致病性试验

选取具有代表性的 3 株病毒分离株分别肌注接种 10 只 10 日龄、30 日龄和 50 日龄无新城疫母源抗体的健康雏鸭进行致病性研究。

1.7 *F* 基因的 RT-PCR 扩增与序列分析

1.7.1 病毒 RNA 提取 参照 Trizol 试剂说明提取病毒 RNA,加入经 DEPC 处理的灭菌超纯水

20 μL 溶解 RNA。

1.7.2 RT-PCR 反应 反转录采用 10 μL 体系,其中 5 \times RT Buffer 2 μL , dNTPs 1.0 μL , Ribonuclease Inhibitor 0.25 μL , M-MLV 0.5 μL , 上游引物 F 1.0 μL , 病毒 RNA 5.25 μL , 混匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。PCR 反应采用 25 μL 体系,其中 ddH₂O 14.2 μL , 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ Free) 2.5 μL , Mg²⁺ 2.0 μL , dNTPs 2.0 μL , 上、下游引物各 1.0 μL , RT-PCR 产物 2.0 μL , rTaq DNA Polymerase 0.3 μL ; 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.3 PCR 产物的克隆与序列分析 回收 PCR 产物, 将回收产物与 pMD18-T Vector 连接过夜, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 均匀涂布于含 Amp 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14~16 h。挑取单个白色菌落小量培养, 作 EcoRI 和 SalI 双酶切鉴定。将阳性质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。利用 DNASTar、MEGA4.0 等软件对测序结果进行拼接和序列分析。

表 2 鸭源新城疫病毒分离株毒力测定结果

Table 2 The result of MDT and ICPI of NDV isolated from duck flocks

菌株 Strain	分离地点 Place	分离年代 Year	鸡胚平均致死时间/h MDT	脑内致病指数 ICPI	毒力 Virulence
SDBZH	滨州 Binzhou	2007	60.0	1.66	V
SDDY	东营 Dongying	2007	50.4	1.71	V
SDJN	济南 Jinan	2007	55.2	1.73	V
SDTA	泰安 Taian	2007	57.6	1.70	V
SDFCH	肥城 Feicheng	2008	56.6	1.78	V
SDWF01	潍坊 Weifang	2007	55.2	1.72	V
SDWF02	潍坊 Weifang	2008	50.4	1.75	V
SDWF03	潍坊 Weifang	2008	52.8	1.68	V
SDWF04	潍坊 Weifang	2009	51.6	1.73	V
SDWF05	潍坊 Weifang	2009	58.0	1.69	V

2.3 致病性试验

3 株 NDV 分离株对不同日龄雏鸭均表现出较高的致病性, 发病率达 70%~100%, 死亡率在 20%~70%(表 3)。10 日龄雏鸭攻毒后 2~5 d 陆续出现精神沉郁、扎堆、采食下降、饮水增加、排黄白色稀便、头颈扭曲、瘫痪等症状, 一般 3~7 d 开始出现死亡。对死亡雏鸭进行剖检, 可见肺脏出血, 腺胃黏膜水肿、增厚, 肠黏膜脱落变薄。30 日龄雏鸭攻毒后,

2 结果

2.1 病毒的分离鉴定与纯化增殖

病料接种 SPF 鸡胚, 盲传至第 2 代进行血凝和血凝抑制试验, 所有分离株尿囊液均能凝集鸡红细胞, 血凝效价在 2²~2⁶, 其中 10 株可被 ND 标准阳性血清所抑制, 而不被 AI(H7、H5、H9 亚型抗血清)和 EDS-76 抗血清抑制, 初步鉴定这 10 株病毒分离株为新城疫病毒。将分离毒株在 CEF 细胞上进行蚀斑纯化, 得到 10 株纯化的病毒, 分别命名为 SDBZH、SDDY、SDJN、SDTA、SDFCH、SDWF01、SDWF02、SDWF03、SDWF04、SDWF05(表 2)。纯化后的毒株接种 SPF 鸡胚传代 4 次后, 血凝效价均稳定在 2⁷~2⁸, 且对 ND 标准阳性血清呈阳性, 对 AI(H7、H5、H9 亚型)标准阳性血清呈阴性。

2.2 致病指数测定结果

10 株 NDV 分离株 MDT 为 50.4~60.0 h, ICPI 为 1.66~1.78, 按照毒力判断标准^[5]表明分离毒株均属于强毒株, 详见表 2。

仅表现出精神沉郁、采食下降、排黄白色稀便等, 没有出现扭头转圈等神经症状; 其剖检变化除肺脏出血, 腺胃黏膜水肿、增厚外, 还表现出腺胃乳头出血, 肠黏膜表面有枣核状肿胀或斑点状出血等, 与自然发病鸭群的剖检变化基本一致。50 日龄的鸭攻毒后临床症状和剖检变化表现轻微, 发病率和死亡率最低, 分别为 70%~80% 和 20%~30%。

表 3 鸭源新城疫病毒分离株对雏鸭的致病性试验

Table 3 Pathogenicity tests of NDV isolates in ducks

菌株 Strain	攻毒剂量 Infection dosage	发病率 Morbidity			死亡率 Mortality		
		10 日龄	30 日龄	50 日龄	10 日龄	30 日龄	50 日龄
SDDY	10 ^{8.7} ELD ₅₀	10/10	10/10	8/10	7/10	4/10	3/10
SDTA	10 ^{8.2} ELD ₅₀	10/10	10/10	7/10	6/10	2/10	2/10
SDWF02	10 ^{8.7} ELD ₅₀	10/10	10/10	7/10	6/10	3/10	2/10

2.4 RT-PCR 扩增和序列分析

经 RT-PCR 扩增、双向测序和拼接校正,得到了 10 株鸭源 NDV F 基因完整序列,GenBank 登陆号为 HM188393-HN188402。序列分析结果表明,10 株病毒 F 基因全长均为 1 792 bp,包含相同的转录起始序列(ACGGGTAGAA)、终止序列(TAA-GAAAAA)和 1 个完整的开放阅读框,编码 553 aa,含有 12 个半胱氨酸残基(25、76、199、338、347、362、370、394、399、401、424 和 523 位)和 6 个潜在的糖基化位点(85、191、366、447、471 和 541 位残基处)。各毒株 F 蛋白裂解位点处氨基酸组成均为¹¹²R-R-Q-K-R-F¹¹⁷,具有 NDV 强毒株的典型分子特征^[6]。

将 10 株鸭源 NDV 与 GenBank 中发表的 41 株其他动物源 NDV 参考毒株(A Y562991、DQ097394、AF077761、GQ288388、NC-002617、EF201805、FJ430159、FJ430160、AY508514、AY741404、EU293914、AY562987、AY288999、AJ880277、AY562989、EF026579、AF431744、AF473851、DQ485231、DQ486859、DQ659677、DQ839397、GQ849007、DQ023198、DQ228923、EF128054、EF592509、FJ480781、DQ417110、DQ363532、FJ240168、FJ480821、FJ754273、GQ255639、DQ227253、DQ363538、FJ882014、FJ882015、AF358786、FJ436306、NDU62620)进行比较,结果表明 F 蛋白氨基酸序列变异位点较多,主要集中在 1—30、101—124、479—494、509—516 aa 处,且多呈散在分布。相对于传统 LaSota、F48E9 和早期 NDV,10 株鸭源 NDV 与近几年分离到的 NDV 在 F 蛋白第 52、71、176、272、314、402 和 489 位出现了较一致的特征性氨基酸替代,即 I⁵²→V、K⁷¹→R、A¹⁷⁶→S、N²⁷²→Y、F³¹⁴→Y、A(V)⁴⁰²→T

表 4 鸭源 NDV F 基因第 334-1 682 bp 间 3 种限制性内切酶酶切位点分布图谱

Table 4 Cleavage site distributions in the F gene (between 334-1 682 bp) of NDV obtained from ducks

毒株 Strain	<i>Hinf</i> I						<i>Bst</i> o I			<i>Rsa</i> I			
	335	736	875	883	1 063	1 400	752	1 116	1 260	973	1 087	1 249	1 625
SDTA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SDBZH	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Others*	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Others*. 代表除 SDTA、SDBZH 外其余 8 株鸭源 NDV

Others*. Represents other eight NDV strains isolated from duck flocks except SDTA and SDBZH

和 D⁴⁸⁹→E。

2.5 同源性分析

对 NDV F 基因编码区核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明,10 株鸭源 NDV 核苷酸同源性在 95.8%~99.9%;与其他 NDV 参考毒株序列同源性为 83.8%~99.8%,与鸡源、鸭源、鹅源、鸽源 NDV 同源性分别为 84.1%~99.0%、83.8%~99.8%、84.1%~99.3%和 86.4%~90.9%;与 2000 年以来国内外分离到的基因 VII 型 NDV 同源性较高,在 95.7%~99.8%;与其他基因型 NDV 及传统 LaSota、F48E9 同源性较低,仅为 83.8%~90.9%。氨基酸比较结果与核苷酸结果相似,10 株鸭源 NDV 氨基酸同源性在 95.5%~100.0%;与鸡源、鸭源、鹅源、鸽源 NDV 同源性分别为 88.1%~98.7%、87.5%~99.8%、88.2%~99.1%和 90.1%~94.9%;与传统 LaSota、F48E9 同源性分别为 88.2%~88.8%和 90.4%~91.1%。

2.6 遗传进化分析

根据 NDV F 基因 47—435 bp 的核苷酸序列对分离毒株进行基因分型,并绘制遗传进化树,结果显示 10 株病毒分离株均与基因 VII d 型 NDV 处于同一分支,表明分离毒株均为基因 VII d 型(图 1)。

2.7 限制性内切酶位点分布

对各分离株 F 基因第 334—1 682 位点间 *Hinf* I、*Bst*o I、*Rsa* I 的酶切位点分布情况进行分析,10 株鸭源 NDV F 基因 *Hinf* I、*Bst*o I、*Rsa* I 的酶切位点的位置和数目大致相同,均在 335、875、1 063、1 400 处有 *Hinf* I 酶切位点,在 752、1 116、1 260 处有 *Bst*o I 酶切位点,在 973、1 087、1 249、1 625 处有 *Rsa* I 酶切位点。此外 SDBZH 在 883 处、SDTA 在 736 和 883 处存在 *Hinf* I 位点(表 4)。

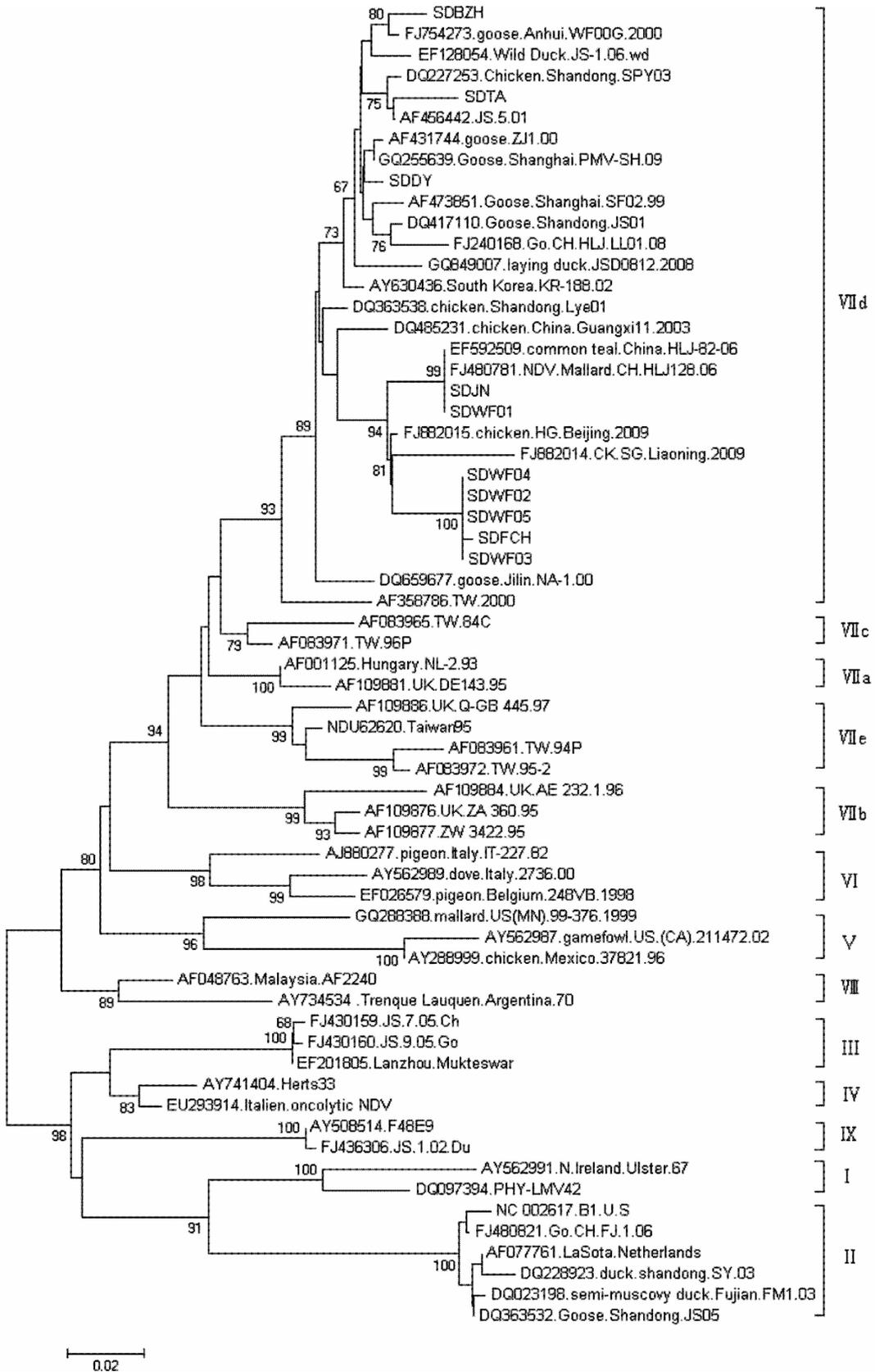


图 1 根据 *F* 基因 47—435 bp 核苷酸序列绘制的遗传进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis based on 47-435 bp nucleotide sequences of *F* gene of NDV

3 讨 论

本研究从山东不同地区发病鸭群中分离和鉴定出了 10 株 NDV, 通过 MDT 和 ICPI 致病指数测定和 F 蛋白裂解位点 112-R-R-Q-K-R-F-117 氨基酸序列分析, 确定了分离毒株为 NDV 强毒株。将 3 株代表毒株人工感染不同日龄雏鸭, 均出现了与自然感染病例相似的临床症状和剖检变化, 进一步证实了 NDV 对鸭已具有较强的致病性。与 10 日龄和 30 日龄雏鸭相比, 50 日龄鸭攻毒后表现出的临床症状和剖检变化轻微, 发病率和死亡率较低, 表明鸭源 NDV 对鸭的致病性与日龄有关, 日龄越小, 发病率和死亡率越高。

分子流行病学研究显示我国目前流行的 NDV 以基因 VII 型为主, 同时兼有 II、III、VI、IX 等其他基因型的散发^[7-10]。通过对分离的 10 株鸭源 NDV 进行基因分型, 所有毒株均属基因 VII d 型, 与早期鹅源 NDV 分子流行特点一致^[6], 表明基因 VII d 型 NDV 是导致水禽 ND 发生和流行的主要病原。吴艳涛等^[10]曾对 1985—2001 年间从鸡群和鹅群中分离到的 NDV 进行分析, 发现鹅源 NDV 在 F 基因 973 位具有从水禽中分离到的 I 型弱毒特有的 *Rsa* I 位点, 并且在 1 249 位出现了其他动物源 NDV 所不具有的 *Rsa* I 位点。本研究分离到的 10 株鸭源 NDV 在 F 基因 973 位和 1 249 位存在 *Rsa* I 位点, 但大多数毒株缺少了 883 位 *Hinf* I 和 872 位 *Rsa* I 位点, 表明这些毒株很可能源于早期流行的鹅源 NDV, 但经过长期进化形成了具有自身特点的新强毒株。

对 51 株 NDV 进行同源性比较, 10 株鸭源 NDV 与近几年分离到的鸡源和鹅源 NDV 均具有较高的同源性及相似的基因型分布, 且在 F 蛋白的第 52、71、176、272、314、402、489 位出现了一致的氨基酸替代, 表明不同禽源 NDV 之间存在密切联系。Otim 等^[11]研究鸭在 NDV 传播过程中的作用时发现, 鸭可以将感染的 NDV 强毒株传给鸡并使鸡致死; 梁华丽等^[12]也曾报道鹅源 NDV 可以通过病鹅以直接接触的方式传染鸡, 引起鸡的发病和死亡。监测研究业已表明水禽对 NDV 的长期地方性流行起重要作用, 野禽、水禽、陆禽之间很可能存在双向传播现象^[7,13-14], 由此可见我国水禽与陆禽混养的传统饲养模式在很大程度上促进了该病在不同禽类之间的传播。

目前, 我国主要采用 Maktesuar (I 系)、LaSota (IV 系) 等疫苗对家禽进行免疫, 然而比较结果显示, 鸭源新城疫流行毒株与疫苗毒株之间的同源性较低, 遗传距离较远, F 蛋白氨基酸序列也存在较大差异。这很可能是导致现有疫苗对鸭不能提供有效保护的一个重要原因。因此, 为搞好鸭新城疫的防控, 在加强鸭源 NDV 的监测, 改变家养水禽与陆禽混养的传统饲养模式的基础上, 应筛选与当前鸭新城疫流行毒株密切相关的 NDV 作为候选疫苗株, 制备针对鸭的新城疫疫苗进行免疫预防, 以控制鸭新城疫的发生和流行。

4 结 论

通过对 2007—2009 年山东不同地区鸭源 NDV 的分离鉴定, 证实山东地区目前流行的鸭源 NDV 以基因 VII d 型为主, F 基因测序分析证实分离毒株在 1 249 位具有大多数鹅源 NDV 所特有的 *Rsa* I 位点, 表明鸭源 NDV 很可能源于早期流行的鹅源 NDV。

参考文献:

- [1] SAIF Y M. Disease of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003: 64-87.
- [2] 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.
- [3] 王永坤, 田慧芳, 周继宏, 等. 鹅副粘病毒病的研究 [J]. *中国畜禽*, 1998, 20(4): 3-5.
- [4] 谭雷涛, 秦卓明, 马保臣, 等. 一株新城疫重组强毒的分离鉴定与分子特性分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(11): 1217-1223.
- [5] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 中国农业科学技术出版社, 2002: 206-209.
- [6] COLLINS M, BASHIRUDDIN J, ALEXANDER D, et al. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity [J]. *Arch Virol*, 1993, 128: 363-370.
- [7] LIU X F, WAN H Q, NI X X, 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 [J]. *Arch Virol*, 2003, 148: 1387-1403.

- [8] QIN Z M, TAN L T, XU H Y, et al. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle Disease Viruse isolates from diffenrent hosts in china from 1996 to 2005 [J]. *Clinical Microbio*, 2008, 46(2):601-611.
- [9] ZHANG R, PU J, SU J L, et al. Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001—2009 [J]. *Vet Microbio*, 2010, 141:246-257.
- [10] 吴艳涛, 倪雪霞, 万洪全, 等. 我国不同地区动物来源新城疫病毒的分子流行病学研究[J]. *病毒学报*, 2002, 3:264-269.
- [11] OTIM O M, CHRISTNSEN H, MUKIIBI G M, et al. A preliminary study of the role of ducks in the transmission of Newcastle disease virus to in-contact rural free-range chickens [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2006, 38:285-289.
- [12] 梁华丽, 童富淡, 华炯钢, 等. 一株分离的鹅副粘病毒的毒力、致病性和传播方式的研究[J]. *浙江农业学报*, 2007, 19(3):151-155.
- [13] 刘秀梵. 家养水禽在 A 型流感和新城疫病毒进化和疾病流行中的作用[J]. *中国家禽*, 2007, 29(15):1-7.
- [14] LEE E K, JEON W J, KWON J H, et al. Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea [J]. *Vet Microbio*, 2009, 134:241-248.

(编辑 白永平)