

鸡传染性支气管炎病毒变异机制的研究进展*

张国庆, 刘 晶, 李广兴**

(东北农业大学动物医学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

Advances in Variation of Avian Infectious Bronchitis Virus Research

ZHANG Guo-qing, LIU Jing, LI Guang-xing**

(College of veterinary medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

关键词: IBV; 变异; 基因; 机制

中图分类号: S852.65

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0192-05

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB), 是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 引起鸡的一种急性、高度接触性传染病, 可引起鸡呼吸道、输卵管、肾脏、肠道及腺胃等多部位病变。病鸡表现为咳嗽、喷嚏、发出气管啰音。幼鸡流鼻液, 蛋鸡产蛋数量和质量下降, 肉鸡食欲不振, 肾型病鸡肾肿大、苍白, 有大量尿酸盐沉积。鸡不分年龄、性别和品种均易感, 但主要侵害 1~4 周龄的幼鸡^[1]。

IB 全球均有分布。1931 年 Schalk 和 Hawn 首次报道了本病, 病鸡临床表现为咳嗽、喷嚏和气管啰音等呼吸道症状, 成年母鸡还见输卵管病变而导致蛋品质下降。1936 年分离出呼吸型 IB 病原, 以 Mass 和 Conn 为代表毒株。1962 年, Winterfield 等首次报道了肾型 IB, 患鸡表现为肾脏肿大、尿酸盐沉积等症状, 分离出以 Holte、Gray 为代表的肾型 IBV 毒株。1985 年, Ambali 在墨西哥首次分离到以 G 株为代表的嗜肠型 IBV 毒株, 主要引起呼吸道、肾脏及肠道病变。20 世纪 90 年代, 又发现临床表现为生长阻滞、消瘦和腹泻, 剖检表现为腺胃肿胀、乳头出血和溃疡, 胸腺、法氏囊萎缩为特征的腺胃型 IB 和以 793/B 为代表株的肌肉发生病变的新型 IB。

近年来, 由于新的 IBV 变异毒株不断出现, 从而导致鸡传染性支气管炎的不断爆发, 造成严重的

经济损失。IBV 血清型比较复杂, 世界上已有不少于 20 种血清型的报道, IBV 面临着不断出现新变异株的问题, 新的变异株在近几年全球都有发生。

1 IBV 基因组

IBV 全长约 27.6Kb, 冠状病毒属 (Coronavirus) 成员, 是不分节段的单股正链 RNA 病毒, 在感染细胞中可转录出 6 种亚基因组 mRNAs, 分别命名为 mRNA₍₁₋₆₎。所有 mRNAs 都具有共同的 3' 末端嵌套式结构, 一个 64 核苷酸的前导序列^[2], 而 5' 末端则长短不一。研究表明, 各 mRNA 上只有在 5' 末端且与它短的 mRNA 不重叠的单一序列才具有编码功能^[3]。现已确定 ORF 的定位次序是 5' -la-lb-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-PolyA-3', 其中包含 4 个结构蛋白。

1.1 S 蛋白

S 蛋白由 mRNA₂ 编码, 位于病毒粒子的囊膜上, 由 2~3 个单体非共价连接成聚合物, 是构成冠状病毒最表层纤突的主要成分, 故也叫纤突蛋白。S 蛋白是 IBV 的主要结构蛋白, 翻译后被切割成 S₁ 和 S₂^[4]。S₁ 蛋白粘附到宿主细胞膜, 并诱导中和及血凝抑制抗体^[5,6], S₁ 还能诱导鸡的特异性 CTL 应答^[7]。S₁ 蛋白的高变区 (Hypervariable region, HVR) 被认为与中和表位相关^[5,8]。对所有 IBV 毒株来说, S₂ 的 N 端第一个氨基酸均是丝氨酸, 其 N

收稿日期: 2003-10-08, 修回日期: 2003-11-13

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (SARS 专项课题)

作者简介: 张国庆 (1976-), 男, 黑龙江密山籍, 硕士, 研究方向为分子病毒学。E-mail: zhangq2008@21cn.com

** 通讯作者: 李广兴 (1968-), 男, 教授, 博士, 研究方向为禽病免疫机理及发病机制。

Corresponding author. Tel: 0451-55190723, E-mail: ligx@mail.neau.edu.cn

端暴露于病毒囊膜外面并被糖基化, S₂ 蛋白的 C 端位于膜内, 并与核衣壳相连。S₂ 糖蛋白可诱发较弱的中和抗体^[9], 靠近 S₂ 的 N 端有一约为 20 个氨基酸的区域, 是一个保守的不依赖于蛋白质构象的抗原位点。

1.2 N 蛋白

N 蛋白全长约 409 个氨基酸, 由 mRNA₆ 编码, 磷酸化后的分子量约 51 kDa。其氨基酸组成中约有 17% 为碱性氨基酸, 其中包括 199 个 His, 42 个 Lys 和 3 个 Arg, 反映了核酸结合蛋白的特点。N 蛋白的主要作用是包裹核酸, 使核酸容易装配入病毒内部, 它与 RNA 复制有关, 即参与病毒的复制。早期认为 N 基因在 IBV 的进化中高度保守^[10], 但近年的研究表明, N 基因在不同毒株间存在变异, 并且这些差异存在于推测的抗原表位和功能相关区域, 提示不同 IBV 毒株 N 基因之间的变异可能影响到病毒的某些生物特性发生改变^[11]。N 蛋白具有较好的免疫原性, 同样能介导鸡的特异性 CTL 应答^[7]。

1.3 M 蛋白

M 蛋白由 mRNA₄ 所编码, M 蛋白 N 端位于病毒粒子外部并被糖基化, 其主要组成部分跨膜 3 次。M 蛋白含有 224~225 个氨基酸, 分子量为 23kDa, M 蛋白横跨囊膜, 大部分在囊膜的内侧面, 仅有一小部分糖基化的 N 端露在膜外, M 蛋白的 N 端有两个糖基化位点。未糖基化的 M 蛋白的分子量为 23 kDa, 随着糖基化程度的不同而形成一系列蛋白: 26 kDa、28 kDa、30 kDa 和 34 kDa。M 蛋白 C 端无明显的亲水区或疏水区^[12]。M 蛋白的作用与病毒的复制有关, M 蛋白在粗面内质网中聚集之处是病毒出芽位点, 它能控制并介导病毒粒子从粗面内质网膜或高尔基体膜出芽, 在病毒装配时与核衣壳相互作用而将其结合到囊膜上, 在有补体存在的情况下可以中和病毒的感染, M 蛋白在细胞内的聚集是其自身的一种性质。

1.4 E 蛋白

E 蛋白或者称小囊膜蛋白 (sM), E 蛋白大部分嵌入在囊膜中, 由 mRNA₃ 的第三个 ORF 编码, 分子量 12.4 kDa, 其与 M 蛋白协同作用, 形成病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP), 后者在 IBV 的粘膜免疫中发挥功能。在病毒的复制过程中, E 蛋白参与 VLP 形成和病毒出芽^[13]。E 蛋白还编码一段与 M 基因转录相关序列, 这段序列 CTTAACAA 在不同 IBV 株间高度保守, 并常在序列分析中用作为 M 基因的起始位点^[14,15]。

1.5 非结构域

mRNA₁ 编码 RNA 多聚酶, 含有 1a、1b 两个 ORF; 其相应表达的产物为 440 kDa 和 300 kDa, 但根据普遍存在于冠状病毒的核糖体移码规律, 在 RNA “假结”结构的促使下, 则应表达一个约 741 kDa 的 1a / 1b 的融合多肽^[16], 然后再被细胞内蛋白酶裂解为相应的功能蛋白。1a 编码产物有两个类木瓜蛋白酶区 (Papain-like proteinase domain, PLPD)、一个 3C 样蛋白酶区 (3C-like proteinase, 3CLP)、一个类生长因子受体区 (Growth factor receptor-like, GFRL)。进一步的序列分析表明, mRNA_{1a} ORF 中的 8937~9357nt 编码 3C 样蛋白酶的功能域, 1b ORF 中 4100~14789nt 则编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 二者都在病毒复制中发挥重要的作用^[17]。mRNA₃ 含有 3a、3b、3c 三个 ORF, 其相应的表达产物分别为 6.7 kDa、7.4 kDa、12.4 kDa, 其中 3c ORF 的启动子效率最高, 12.4 kDa 产物的表达量最大, 编码 E 蛋白, 其疏水的氨基酸组成特点揭示了该 E 蛋白与病毒囊膜的嵌合, 这可能与病毒的复制有关^[13]; mRNA₅ 含有 5a 和 5b 两个 ORF, 其相应的表达产物大小为 7.5 kDa 和 9.5 kDa, 其中 7.5 kDa 的 65 个氨基酸中亮氨酸为 17 个, 约占 26%, 显示了强烈的疏水性, 与囊膜相连, 但它不具备一个常规的跨膜区域。

2 IBV 病毒变异的理论基础

关于病毒的突变理论, 存在着两种观点。一种认为, 基因突变是随机自由发生的, 病毒基因组上任何位置随时都可出现突变, 因此对传染性支气管炎病毒的克隆来说, 均存在一些具有突变的病毒粒子, 并且 RNA 病毒 IBV 较其它 DNA 病毒更为明显。另一种观点认为, 正如病毒对某些化学药物的抵抗或依赖那样, IBV 突变是病毒在新的生活条件下, 借合成途径的某些改变而发生的。IBV 在宿主免疫过程中, 由于外界环境和宿主体内的适应性变化使得 IBV 基因组发生变化, 产生新的 IBV 变异株。

IBV 的变异主要是基因的点突变、基因重组、基因缺失和基因插入。近年来的一些研究表明, 在免疫压力下, 常常能够在免疫鸡群中分离到与免疫毒株同源性不是很高的新毒株^[18]。

单股 RNA 病毒复制缺乏像 DNA 病毒复制过程中 DNA 聚合酶那样的校对功能, IBV RNA 复制酶的“错配率”在 $10^{-3} \sim 10^{-4}/nt$, RNA 复制酶的低保真性决定了 RNA 病毒没有固定序列的基因组, IBV 的 RNA 基因组长度较大, 约为 $3 \times 10^4 nt$, 所

以每个复制循环大约可以产生 3 个突变, IBV 的 RNA 分子因随机突变不可能维持其均一性。显然在错配率一定的情况下, RNA 越长, 则可能丢失的信息就越多。另外, mRNA 的合成是不连续的, 未合成完全的 mRNA 可从模板上脱落下来形成游离的 mRNA 中间体, 这些中间体又可重新结合到模板上继续合成。加之 RNA 聚合酶在转录过程中缺乏校对功能, 在混合情况下, 这种重新结合可能发生在不同毒株的 RNA 模板与 mRNA 中间体之间, 造成了不同毒株基因组的每一轮复制都有可能诱发一个至数个碱基发生突变^[19,20]。

3 IBV 变异及生物进化

IBV 新毒株的出现主要由 IBV 基因组发生突变和重组引起。如果从新毒株的来源分析, 可分为以下几点:

3.1 疫苗株的适应性变化及免疫压力造就“新毒株”

在长期应用 IB 疫苗的地区, 仍然不断有 IB 爆发的报道^[21,22]。由于活毒 IB 疫苗的高突变率和高重组率, 在疫苗株引起 IB 爆发的鸡群中, 出现与疫苗株差异较大的新 IBV 毒株的流行和传播。提示应用疫苗后, 疫苗株在某种情况下, 产生了新的基因型或血清型 IBV^[22,23]; 而另外一些变异型 IBV 仅有微小的核酸序列组成改变^[24,25]。Smati^[26]等人从魁北克长期应用 H₁₂₀ 疫苗株地区鸡群中分离到一株在进化树上不同于其他 IBV 的新毒株。其氨基酸变化发生在 S₁ 基因 HVR-2 的 118-119aa 和 141-146aa, 且插入 Cys-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys 片段可能与病毒 RNA 二级结构茎环结构形成有关, 并且其硫键可能触发重要的表位改变。而所谓的经免疫压力产生的新毒株, 即指在免疫压力下演化而来的抗原突变株。如 DE072 从 D1466 疫苗株演变而来, GA98 从 DE072 疫苗株进化而来, 疫苗株和“新毒株”二者除抗原性不同外, 在形态结构、生物学性状、致病机制以及其所引起的宿主病变和症状等各方面都颇类似^[21]。Farsang^[27]等将瑞典 1994~1998 年 IBV 流行株进行“诊断” PCR 研究后认为, IBV 流行株归属于 Mass 血清型和 Dutch 血清型。一个有趣的现象是, 与 D274 疫苗株 S₁ 基因有 99% 同源性的分离株 SE/722/95 是在与 Mass 血清型 SE/748/95 分离株仅隔 5 公里的鸡场分离得到的 (二者间隔 2 个月)。这意味着病毒的变异在小范围内同时传播并且相互间独立发展。对 1997 年以前及以后的分离株进行系统研究, 1997 年之前的分离株均表现为

Mass 血清型; 在 1997 年之后, IBV 分离株表现出与疫苗株较强的同源关系 (S₁ 基因同源性在 86%~94%), 而瑞典恰是在 1997 年开始引入 Dutch 疫苗株, 考虑到 S₁ 基因不仅在基因重组时发生变异, 并可能因点突变、基因插入和缺失而不同, Farsang 作出大胆推测, 如果 S₁ 基因在分离株和疫苗株间有 840nt 是完全相同的, 那么就可作出此分离株是由疫苗株演变而来的判断。

IBV 新毒株产生以后, 在宿主体内以较快的速度进行变异分化。GA98 从 DE072 疫苗株进化而来, 其核苷酸突变率较 DE072 高, 进化快^[21]。病毒进化的同时, 增加了病毒的多样性, 目前的研究认为“流感病毒”就是依赖病毒的变异来不断突破宿主界限和逃避宿主的免疫保护^[28]。但是 IBV 疫苗变异株是如何逃避宿主免疫系统识别, 还不是十分明了^[29]。

3.2 引进“新毒株”

引进“新毒株”主要指新品种的带毒引入及国外疫苗株的引进产生非本地区的新流行株。优良赛鸽和肉质鲜美的珠鸡常常是冠状病毒的携带者^[30,31], 随着商品的交易, 他们可能将病毒从一处传播到另一处。从赛鸽和珠鸡体内分离到的冠状病毒均表现出与 IBV 发生 HI 交叉反应, 将分离病毒进行 SPF 鸡动物回归试验, 患鸡表现出鸡传染性支气管炎的一些典型症状, 如气管啰音、肾炎病变, 并能引起鸡胚的生长抑制, 呈现“侏儒胚”、“矮小胚”。Ito 等^[31]从珠鸡分离病毒传代尿囊液的负染电镜中观察到典型的日冕型病毒粒子。

另外, 长徙候鸟的带毒传播可能也是新 IBV 流行株突然发生的一个可能。虽然目前还缺少这方面的证据来说明长徙候鸟参与 IBV 的传播。但是候鸟在禽流感、新城疫等疾病中作为病毒携带者参与疾病的传播, 引发大规模的传染病爆发已有报道^[32,33]。

3.3 基因突变产生新毒株

基因突变包括基因缺失、基因插入、基因点突变。基因的任何一种改变, 都可能对整个 IBV 病毒基因组的改变产生影响。

目前的研究表明, IBV 的 S 蛋白、N 蛋白、M 蛋白在病毒的进化上均表现出变异现象, 其中又以 S 蛋白的变异最为明显^[15,21,26,34,35]。IBV 变异株 S 基因的微小改变, 可能引起 IBV 抗原性发生大的变化^[21,36], 比较 DE072 与 GA98 系 IBV 之间核苷酸的同源性为 91.2%~96%, 氨基酸同源性稍低, 为 88.6%~92.1%, 说明发生在 GA98 系 IBV 的核苷酸改变大多是非同义突变。在 GA98 S₁ 基因 421bp HVR 中, 有 17 个核苷酸突变位点, 点突变已经发

生在从 DE072 到 GA98 系 IBV 的长期积累中。应用线性回归分析表明, GA98 的核苷酸突变率为 1.5%, 氨基酸突变率为 2.5%, 较其他毒株的进化要快很多 (793/B 株仅 0.3% 核苷酸突变率) [21]。

早期的研究认为 IBV N 基因是高度保守的, 氨基酸同源性在各分离株之间不低于 91.4%~92.9%, 并且上述结论不受地域和免疫压力等因素影响长达 30 年之久, N 基因的 242~296nt 是其完整的保守区 [10]。Sapats [34] 等人对 IBV 的 N 基因进行同源性分析发现, N 基因在进化过程发生了很大的变化。N 基因的变异多发生在 C 端下游 337 位核苷酸之后, 并大多数位于 7-23nt 和 339-401nt。对三株澳大利亚 IBV 分离株的 N 蛋白氨基酸的同源性序列分析发现, N1/88、Q3/88 和 V18/91 在进化上发生了较大的变异, 氨基酸同源性与其他 IBV 仅有 60.0%~63.6%, 即使在进化上归为同组的三株 IBV 之间氨基酸同源性也仅为 85.8%~89.2%, 连最保守的 242-296nt 区域在三株 IBV 间也不保守。N1/88 和 Q3/88 表现为氨基酸缺失, 分别由 404aa 和 408aa 组成, 而不是 409aa。

Quebec (魁北克) 分离株 Qu16、Qu_mv 和 Q_37zm 在 S₁ 基因 HVR-1 与 M41、Beau、Ark、Gray、CU-T2 相比较有一个氨基酸缺失, 并且在 HVR-1 的 71~74aa 是氨基酸发生变异的主要区域。Quebec 分离株与 M41、Beau、Ark、Gray、CU-T2 氨基酸同源性分析表明, S₁ 基因 HVR-2 氨基酸变化在分离株 Qu16、Qu_mv 和 Q_37zm 主要集中在两个区域, 118~120aa 和 140~146aa。但对于 Quebec 分离株 (Qu16、Qu_mv 和 Q_37zm) 来说, 其 118~120aa: Arg-Ser 和 141~146aa: Cys-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys 是完整的插入序列, 在三个分离株间绝对保守 [26]。Cys 残基在 Cys-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys 片断中可能形成 Cys 环, 并且 Cys 可能与一个包含分子间二硫键的茎环结构形成有关, 而后者是病毒中和表位区域 [37]。Quebec 分离株的 Cys-Ser-Asn-Ala-Ser-Cys 插入可能因此触发重要的表位发生改变。同时对 S₁ 基因的 HVR 的 51~167aa 的 4 个 NXT 和 NXS (X≠P) 糖基化基序分析发现, 残基 X 已经被 N 置换, 所有的 Quebec 分离株 S₁ 基因形成新的 NXS 基序, 尽管并不清楚这些基序是否全部糖基化, 但发生在 S₁ 的糖基化修饰及 HVR 区的 Cys 残基形成的茎环可能使 Quebec 分离株发生抗原漂移。糖基化修饰作用对抗原的影响已有详尽综述 [38]。

4 结语

IBV 是长期以来困扰养禽业的主要疾病之一, 由于其病毒结构和基因组的特点, 在疾病传播的同时, 常伴随着病毒基因的变异。野生 IBV 株与 IBV 疫苗株之间可进行基因重组 [21, 27], 使得应用活毒疫苗预防 IB 在生物安全问题上提出新的思考。IBV 对环境的适应、免疫压力、基因重组及基因发生的插入、缺失和点突变均可造成 IBV 变异株的产生, 且一旦这种变异株在环境中能够长期存在, 就将成为决定 IBV 变异趋势的因素之一。IBV 的变异往往不是以某一种形式发生, 常常是基因型变异和血清型变异交替发生或是同时存在, 另外组织嗜性也在不断的发生变化。以 Ignjatovic [39] 等的研究为例, 澳大利亚 60~70 年代 IBV 流行株主要是肾型; 到 80~90 年代初期, 呼吸型 IB 成为主要困扰养禽业的疾病; 80 年代后期, 呼吸型 IB 常伴有不断变化的组织嗜性。鉴于以上种种情况, IBV 成为人们研究 RNA 病毒遗传变异的热点。随着分子生物学的发展, 人们最终会彻底阐明 RNA 病毒的遗传变异机制, 为从根本上防制疾病做出贡献。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科技出版社, 1997. 671-704.
- [2] Dalton K, Casais R, Shaw K, *et al*. Cis-acting sequences required for coronavirus infectious bronchitis virus defective-RNA replication and packaging[J]. J Virol, 2001, 75(1): 125-133.
- [3] Stern D F, Sefton B M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins[J]. J Virol. 1982. 44(3): 794-803.
- [4] Collisson E W, Parr R L, Li W, *et al*. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus[J]. Poultry Science Rev. 1992, 4: 41-55.
- [5] Ignjatovic J, Galli L. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens[J]. Arch Virol, 1994, 138(1-2): 117-134.
- [6] Kant A, Koch G, van Roozelaar D J, *et al*. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide[J]. J Gen Virol, 1992, 73(3): 591-596.
- [7] Collisson E W, Pei J, Dzielawa J, *et al*. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry[J]. Dev Comp Immunol. 2000, 24(2-3): 187-200.
- [8] Lenstra J A, Kusters J G, Koch G, *et al*. Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus[J]. Mol Immunol, 1989, 26(1): 7-15.
- [9] Kusters J G, Niesters H G, Bleumink-Pluym NM, *et al*. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in The Netherlands[J]. J Gen Virol. 1987, 68(2): 343-352.

- [10] Williams A K, Wang L, Sneed LW, *et al.* Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses[J]. *Virus Res*, 1992, 25(3): 213-222.
- [11] Seah J N, Yu L, Kwang J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 75(1): 11-16.
- [12] Spaan W, Cavanagh D, Horzinek M C. Coronaviruses: structure and genome expression[J]. *J Gen Virol*. 1988, 69(12): 2939-2952.
- [13] Corse E, Machamer C E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction[J]. *Virology*. 2003, 312(1): 25-34.
- [14] Cavanagh D, Mawditt K, Welchman Dde B, *et al.* Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys[J]. *Avian Pathol*, 2002, 31(1): 81-93.
- [15] Jia W, Naqi S A. Sequence analysis of gene 3, gene 4 and gene 5 of avian infectious bronchitis virus strain CU-T2[J]. *Gene*, 1997, 189(2): 189-193.
- [16] Brierley I, Digard P, Inglis S C. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot[J]. *Cell*, 1989, 57(4): 537-547.
- [17] Liu D X, Brown T D. Characterisation and mutational analysis of an ORF 1a-encoding proteinase domain responsible for proteolytic processing of the infectious bronchitis virus 1a/1b polyprotein[J]. *Virology*, 1995, 209(2): 420-427.
- [18] 刘胜旺, 杜恩歧, 孔宪刚, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 LX4 株 mRNA₅ 和 mRNA₆ cDNA 的分子特征[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(3): 265-270.
- [19] Strauss E G, Strauss J H. RNA viruses: genome structure and evolution[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1991, 1(4): 485-493.
- [20] Domingo E. Rapid evolution of viral RNA genomes[J]. *J Nutr*, 1997, 127(5): 958-961.
- [21] Lee C W, Jackwood M W. Origin and evolution of Georgia 98(GA98), a new serotype of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Res*, 2001 80(1-2): 33-39.
- [22] Wang L, Junker D, Collisson EW. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. *Virology*, 1993, 192(2): 710-716.
- [23] Yu L, Jiang Y, Low S, *et al.* Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens[J]. *Avian Dis*, 2001, 45(2): 416-424.
- [24] Shi Q, Wang C, Keirs R W. Genetic relationships of infectious bronchitis virus isolates from Mississippi broilers[J]. *Avian Dis*, 2000, 44(1): 66-73.
- [25] Mondal S P, Lucio-Martinez B, Naqi SA. Isolation and characterization of novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DE072[J]. *Avian Dis*, 2001, 45(4): 1054-1059.
- [26] Smati R, Silim A, Guertin C, *et al.* Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec[J]. *Virus Genes*, 2002, 25(1): 85-93.
- [27] Farsang A, Ros C, Renstrom L H, *et al.* Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain[J]. *Avian Pathol*, 2002, 31(3): 229-236.
- [28] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 第一版. 北京:科学出版社, 2001, 4-19.
- [29] Wang L, Xu Y, Collisson E W. Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus[J]. *Virus Res*, 1997, 49(2): 139-145.
- [30] Barr D A, Reece R L, O'Rourke D, *et al.* Isolation of infectious bronchitis virus from a flock of racing pigeons[J]. *Aust Vet J*, 1988, 65(7): 228.
- [31] Ito NMK, Miyaji CI, Clitilde EMPDMC. Study on broiler IBV and IB-like virus from guinea fowl[C]. In E.F.Kaletka&U.Heffels-Redmann, II International Symposium on Infectious Bronchitis, Giessen, Justus-Liebig University, 1991, 302-307.
- [32] Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, *et al.* Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs[J]. *Arch Virol*, 1995, 140(7): 1163-1172.
- [33] Kommers G D, King D J, Seal B S, *et al.* Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(2): 319-329.
- [34] Sapats S I, Ashton F, Wright P J, *et al.* Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus[J]. *Virology*, 1996, 226(2): 412-417.
- [35] Sapats S I, Ashton F, Wright P J, *et al.* Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77 (3): 413-418.
- [36] Moore K M, Bennett J D, Seal B S, *et al.* Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California[J]. *Virus Genes*, 1998, 17(1): 63-83.
- [37] Wang L, Xu Y, Collisson E W. Experimental confirmation of recombination upstream of the S1 hypervariable region of infectious bronchitis virus[J]. *Virus Res*, 1997, 49(2): 139-145.
- [38] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence [J]. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978, 47: 45-148.
- [39] Ignjatovic J, Ashton D F, Reece R, *et al.* Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus[J]. *J Comp Paehol*, 2002, 126(2-3): 115-123.