



**HAL**  
open science

## Vaccination contre la maladie de Newcastle avec des variants et différenciation entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux

Véronique Jestin, Martine Cherbonnel, Georges Bennejan

### ► To cite this version:

Véronique Jestin, Martine Cherbonnel, Georges Bennejan. Vaccination contre la maladie de Newcastle avec des variants et différenciation entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1991, 22 (1), pp.25-39. hal-00902006

**HAL Id: hal-00902006**

**<https://hal.science/hal-00902006>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Vaccination contre la maladie de Newcastle avec des variants et différenciation entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux

V Jestin, M Cherbonnel, G Bennejan

*CNEVA, Laboratoire central de recherche avicole et porcine, unité de recherche de Pathologie Aviaire  
BP 53 22440 Ploufragan, France*

(Reçu le 6 avril 1990; accepté le 24 juillet 1990)

**Résumé** – Trois variants a25, b23 et a16 du virus de la maladie de Newcastle (NDV) souche La Sota résistant à la neutralisation par l'anticorps monoclonal (Ac Mo) anti-HN 3115 ont été sélectionnés; après clonage et démonstration par inhibition de l'hémagglutination, ELISA et Western blot de leur absence de réactivité avec cet Ac Mo, ils ont été utilisés comme vaccins expérimentaux chez le poulet. L'index de pathogénicité par voie intracérébrale (IPIC) des variants a25 et b23 était faible (respectivement 0,2 et 0,0). Trois à quatre semaines après leur administration par instillation oculaire (variants non inactivés) et par voie sous-cutanée (b23 inactivé), la protection qu'ils ont conférée vis-à-vis d'une épreuve virulente n'a pas été différente de celle apportée par la souche La Sota. Les taux d'anticorps induits par le variant a25, mesurés par 2 tests ELISA bloquants utilisant le premier un Ac Mo 2114 spécifique du virus NDV, le second l'Ac Mo 3115, ont été significativement inférieurs ( $P < 0,001$ ) à ceux résultant d'une épreuve expérimentale, alors que la différence entre les taux d'anticorps induits par la souche La Sota et les taux d'anticorps post-infectieux était faible ( $P < 0,02$ ). Les taux d'anticorps mesurés par le test ELISA 3115 n'a pas varié chez des poulets exposés à 3 contacts successifs avec le variant b23 vivant, ce qui a constitué un critère nécessaire mais non suffisant d'appréciation de la stabilité de ce dernier. Parallèlement la diffusibilité de ce variant est apparue faible. La vaccination avec les 2 variants a25 et b23 pourrait donc être envisagée pour différencier les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux.

**vaccination / Newcastle / variant / ELISA / anticorps monoclonaux**

**Summary** – *Vaccination against Newcastle disease with variants and differentiation between post-vaccinal and post-infectious antibodies. Three monoclonal antibody (anti-HN Mab 3115) resistant variants of the Newcastle disease virus (NDV) La Sota strain, were selected (a<sub>25</sub>, b<sub>23</sub>, a<sub>16</sub>); once cloned and shown by haemagglutination inhibition, ELISA and Western blot, not to bind to Mab 3115 they were used as experimental vaccines for chicken. The intracerebral pathogenicity index (ICPI) of a<sub>25</sub> and b<sub>23</sub> variants was low (0.2 and 0.0 respectively). Three to 4 weeks post-administration of alive variants or inactivated b<sub>23</sub>, respectively administered via eye drop and subcutaneously, the protection against a challenge was not different from that following*

La Sota vaccination. Antibody titers induced by a25 and b23, as measured by 2 ELISA blocking tests (the first employing a NDV specific Mab 2114, the second employing Mab 3115), were significantly lower ( $P < 0.001$ ) than post-challenge antibody titers. On the contrary, the difference between post-La Sota vaccination antibodies and post challenge antibodies was weak ( $P < 0.02$ ). Following 3 successive exposures by contact of chickens to live b23 variant, no variation in antibody titers was observed as measured by ELISA employing Mab 3115. This constituted a necessary criterion, but insufficient to test the stability of the b23 variant. At the same time, the latter exhibited poor ability to diffuse. Vaccination with these variants should be considered in differentiating post-vaccinal from post-infectious antibodies.

### **Vaccination / Newcastle / variant / ELISA / monoclonal antibodies**

## **INTRODUCTION**

La prophylaxie médicale de la maladie de Newcastle (ND) repose actuellement sur l'utilisation de vaccins à virus atténué et (ou) inactivé (Meulemans, 1988), préparés à partir de virions complets. Ces vaccins induisent des réponses sérologiques qui sont difficilement différenciables de celles induites par des souches sauvages (Alexander, 1988). Aussi la distinction entre volailles vaccinées et volailles infectées est-elle délicate ce qui constitue un inconvénient sérieux, tant pour la mise en place de mesures sanitaires rigoureuses, que pour les échanges internationaux de volailles.

Le recours à des vaccins constitués de virions présentant des modifications de leur génome et de leurs protéines bien caractérisées, apporte une solution au problème précédent, sous réserve que ces changements d'une part, n'altèrent pas le pouvoir immunogène et ne compromettent pas l'innocuité du produit final, d'autre part, soient aisément décelables au plan diagnostic. Pour obtenir ces mutants et ces variants, plusieurs procédés peuvent être employés, notamment : manipulation du génome par des techniques de bio-

logie moléculaire ou sélection de sous-populations existant naturellement.

Chez le porc, on utilise comme vaccin une souche du virus de la maladie d'Aujeszky, présentant une délétion génomique (gl-), obtenue par manipulation génétique, (Quint *et al*, 1987); le titrage en parallèle des anticorps spécifiques du virus de la maladie d'Aujeszky et des anticorps spécifiques de la protéine gl permet de différencier les animaux vaccinés avec cette souche des autres, vaccinés avec des vaccins classiques ou infectés (Van Oirschot *et al*, 1986).

Des mutants du virus ND résistant à la neutralisation par des anticorps monoclonaux anti-HN et anti-F reconnaissant respectivement l'hémagglutinine-neuraminidase et la protéine de fusion, ont déjà été obtenus (Nishikawa *et al*, 1983; Russel, 1984; Samson *et al*, 1985; Iorio and Bratt, 1985; Iorio *et al*, 1986; Abenes *et al*, 1986a; Abenes *et al*, 1986b; Meulemans *et al*, 1987; Samson *et al*, 1988; Toyoda *et al*, 1988; Yusoff *et al*, 1988; Gotoh *et al*, 1988; Neyt *et al*, 1989). Ils ont essentiellement été utilisés pour la compréhension de l'organisation moléculaire de ces glycoprotéines et de leur fonction. En outre Meulemans *et al*, 1987, ont

montré la possibilité d'obtenir ainsi des variants possédant un pouvoir pathogène réduit par rapport à la souche d'origine. Cependant leur intérêt pour la vaccination avec l'objectif exposé ci-dessus, n'a pas été exploré.

Cet article se propose de présenter l'obtention de virus variants de la maladie de Newcastle obtenus par immunosélection à l'aide d'un anticorps monoclonal et de montrer leur intérêt pour différencier les anticorps post vaccinaux des anticorps post infectieux. À cette fin les réponses sérologiques de poulets vaccinés avec des souches classiques et variantes et de poulets infectés avec des souches sauvages, ont été comparées. Deux tests ELISA bloquants (Jestin *et al.* 1989b) ont été effectués en parallèle en vue de titrer, à l'aide d'anticorps monoclonaux, les anticorps spécifiques du virus ND et les anticorps spécifiques de la protéine HN non modifiée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Anticorps monoclonaux (Ac Mo)*

Les modalités d'obtention et les caractéristiques des Ac Mo cités dans le tableau II ont été préalablement décrites (Jestin *et al.*, 1989a).

En bref l'Ac Mo 3115 reconnaît la protéine HN et inhibe un certain nombre de caractéristiques biologiques du virus; il inhibe notamment fortement son activité hémagglutinante et neutralise son pouvoir pathogène. Il a été, de plus, montré (Jestin *et al.*, 1989b) que cet Ac Mo, utilisé dans un test ELISA bloquant, permettait de détecter, dans les sérums testés, des anticorps spécifiques du virus de la maladie de Newcastle, quelle que soit la souche virale.

L'Ac Mo 2114 n'inhibe aucune des propriétés biologiques connues du virus,

mais il se lie spécifiquement comme cela est révélé par le test ELISA, aux 58 souches testées du virus de la maladie de Newcastle.

Les autres Ac Mo concernés sont très utiles comme marqueurs moléculaires des souches NDV.

### *Obtention et caractérisation des variants*

L'ascite 3115 diluée au 1/30 a été incubée avec 10<sup>7,8</sup> Dose infectant 50 % des embryons (DIE50) d'une souche lentogène du virus ND dérivée de la souche La Sota et clonée (clone 30 Intervet, Angers), volume à volume pendant 2 h à 37 °C. À l'issue de la neutralisation, 88 œufs de poule exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) de 9 j ont été inoculés par voie allantoïque à raison de 0,1 ml chacun du mélange préparé précédemment. Les liquides allantoïques ont été récoltés individuellement 4 j après et ont été analysés par inhibition de l'hémagglutination (IHA) et ELISA avec les anticorps monoclonaux précités selon la technique déjà mentionnée (Jestin *et al.*, 1989a). Les variants ainsi sélectionnés ont fait l'objet de 2 clonages successifs par dilution limite en liquide allantoïque d'œufs de poule EOPS, puis ils ont été amplifiés et titrés sur œufs embryonnés de poule EOPS de 9 j. Ils ont été analysés avec les Ac Mo précités comme décrit dans le tableau II.

### *Western blot*

Le transfert sur papier de nitrocellulose des protéines après électrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a été réalisé selon la méthode de Towbin *et al.*, (1979). En bref, les souches virales purifiées La Sota et variantes a25, b23, a16, préalablement ajustées à une même concentration de protéines (25 µg par dépôt), ont été bouillies pendant 5 min en tampon tris 25 mmol/l-glycine 193 mmol/l pH 8,3, 1 % SDS dépourvu de 2-mercaptoéthanol, puis séparées sur un gel de polyacrylamide à 8,5 % pendant 17 h à 70 V. Des protéines standard précolorées (Gibco BRL/Cergy Pontoise France) ont été

déposées simultanément. L'électrophorèse achevée, les protéines ont été transférées sur du papier de nitrocellulose (Schleicher et Schuell/Dassel, Allemagne) pendant 4 h à 350 mA. Chaque bande de papier précédent a été incubée soit avec l'Ac Mo 3115 dilué au 1/100 en PBS, pH 7,4, contenant de la sérumalbumine bovine 1 %, soit avec un liquide d'ascite négatif, soit avec un sérum polyclonal de souris anti-NDV dilués de la même façon. Les anticorps ainsi complexés ont été détectés avec un conjugué anti-Ig de souris marqué à la peroxydase (KPL/Gaithersburg USA) et visualisés avec du 1-2 chloronaphtol (Sigma/La Verpillière France) à 0,5 mg/μl en PBS pH 7,4, méthanol (5V/1V), 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Essais sur poulets EOPS**

#### **Pathogénicité par voie intracérébrale pour le poussin d'1 jour**

La méthode rapportée par Alexander (1988) a été utilisée pour déterminer, sur poussins EOPS d'1 j, l'index de pathogénicité par voie intracérébrale (IPIC) des variants sélectionnés.

#### **Immunité conférée par les variants non inactivés**

La méthode recommandée par la pharmacopée européenne pour le contrôle d'activité des vaccins de la maladie de Newcastle à virus atténué, a été mise en œuvre (Anonyme, 1989). En bref, sauf mention spéciale, 20 poulets EOPS âgés de 3 semaines ont été vaccinés par instillation oculaire avec chacun des variants (10<sup>6.5</sup> DIE50/poulet) et maintenus dans des animaleries protégées séparées; puis ils ont été soumis à une épreuve virulente, selon les conditions précisées dans le tableau III.

La protection ainsi enregistrée a été comparée à celle obtenue avec un vaccin La Sota (Sotasec Rhône Mérieux/Lyon France) du commerce administré selon les mêmes conditions.

Des prélèvements de sang ont été effectués à la veine alaire chez les poulets

précédents ainsi que sur des poulets de la même origine et du même âge ayant en outre reçu un rappel vaccinal, 20 j après, selon les mêmes conditions. Ces sérums ont été analysés par le test IHA et les tests ELISA bloquant décrits ci-après.

#### **Immunité induite par le variant b 23 inactivé**

La méthodologie précisée dans le tableau V a été appliquée. Le variant b23 a été inactivé au formol 0,75 % pendant 48 h à température ambiante. Deux préparations vaccinales du variant inactivé, mélangées ou non avec de l'adjuvant incomplet de Freund, ont été ainsi testées (tableau V). Des prises de sang ont été effectuées aux dates mentionnées dans le tableau VI et analysées par IHA et ELISA bloquant. À titre de comparaison, les mêmes analyses ont été effectuées sur les sérums provenant de poulets vaccinés avec le vaccin inactivé Binewvaxidrop (Rhône Mérieux Lyon), ainsi que sur les sérums provenant des poulets vaccinés puis éprouvés comme mentionné dans le tableau VI.

#### **Stabilité génétique du variant b 23 *in vivo* après passages en série par contact**

Vingt poulets (P<sub>1</sub>) EOPS âgés de 3 semaines ont été vaccinés par instillation oculaire à raison de 10<sup>6.5</sup> DIE50 du variant b23 par poulet; 5 j après, 5 d'entre eux ont été transférés dans une autre animalerie protégée et placés en contact étroit avec 20 poulets (P<sub>2</sub>) EOPS du même âge que les précédents. Cinq jours plus tard, 5 poulets P<sub>2</sub> étaient transférés dans une nouvelle animalerie et mis en contact avec 20 poulets (P<sub>3</sub>) EOPS de 3 semaines et demie. Dix mises en contact en série étaient programmées, de sorte qu'à chaque fois, 5 poulets (P<sub>n</sub>) fussent transférés dans une animalerie protégée propre et mis en contact avec 20 (25 pour passages P<sub>5</sub> et P<sub>10</sub>) poulets EOPS âgés de 3 à 5 semaines (P<sub>n</sub> + 1), avec une pé-

riodicité de 4-5 j. En fait, seulement 5 mises en contact ont été réalisées en raison de l'échec du contagement à partir du 5<sup>e</sup> passage (Cf résultats). Cinq poulets P<sub>5</sub> ont été sacrifiés 5 j après leur mise en contact avec les poulets P<sub>4</sub>; leurs cerveau, foie, rate, contenu intestinal (dont écouvillonnage cloacal) ont été prélevés stérilement et congelés à -20 °C en vue d'essai d'isolement du virus. À chaque passage, les 15 poulets restant dans l'animalerie d'origine étaient maintenus en observation pendant 3 semaines, après lesquelles ils ont été sacrifiés et leur sang recueilli (tableau VII).

### Tests sérologiques

Les sérums récoltés au cours des essais décrits précédemment, ont été analysés par IHA (Alexander, 1988) et 2 tests ELISA bloquants. Ces derniers mettaient en œuvre chacun un anticorps monoclonal différent : l'un dénommé 3115 (anticorps spécifique de la protéine HN non modifiée), l'autre dénommé 2114 (anticorps spécifique du virus ND). Les modalités techniques du premier test ELISA ont déjà été préalablement décrites (Jestin *et al*, 1989b). En bref, dans les plaques sensibilisées avec la souche B<sub>1</sub> du virus NDV, multipliée en liquide allantoïque, furent incubées successivement, avec des étapes de lavage intermédiaires : le sérum à tester (dilué de 1/2 en 1/2) pendant 15 min à 37 °C, puis selon les mêmes conditions, l'Ac Mo 3115 couplé à la peroxydase, et enfin le substrat orthophénylènediamine (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le titre du sérum a été exprimé comme l'inverse de la dilution de sérum bloquant à 90 % la fixation de l'Ac Mo 3115 sur l'antigène. Quant au 2<sup>e</sup> test, il était très similaire au précédent avec les différences suivantes : sensibilisation des plaques avec la souche virale Ulster 2C, durée d'incubation des sérums à titrer et de l'anticorps monoclonal 2114 : 1/2 h à 37 °C, utilisation d'un sérum anti-Ig de souris marqué à la peroxydase (KPL/Gaithersburg, USA) et incubation de celui-ci pendant une 1/2 h à 37 °C. Le titre du sérum était alors exprimé comme l'inverse de la dilution de sérum bloquant à 80 % la fixation de l'Ac Mo 2114 sur l'antigène. Les taux d'anticorps mesurés par

le test IHA étaient exprimés comme l'inverse de la dilution de sérum inhibant totalement l'hémagglutination virale.

### Isolement de virus

Les organes collectés ont subi après préparation (Alexander, 1988), 3 passages sur œufs embryonnés de poule EOPS de 9-10 j par voie allantoïque; à chaque passage des tests d'hémagglutination ont été effectués selon la technique rapportée (Alexander, 1988).

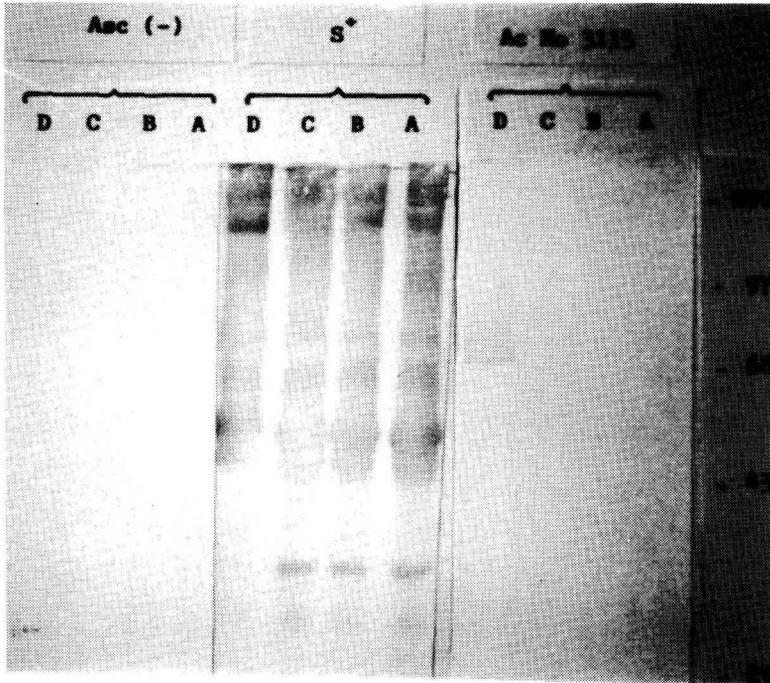
### Analyse statistique

Pour comparer les pourcentages de protection (tableaux III et V), le test du  $\chi^2$  a été utilisé. Pour comparer les taux d'anticorps observés selon les traitements réalisés (tableaux IV, VI et VII), le test *t* de comparaison des moyennes a été mis en œuvre.

## RÉSULTATS

### Obtention et caractérisation des variants

Cinquante cinq variants présentant un titre faible (<40) par inhibition de l'hémagglutination avec l'Ac Mo 3115, ont été obtenus. Ils ont été également analysés par ELISA avec le même Ac Mo ainsi qu'avec l'Ac Mo 2114. Des réactivités variables ont été ainsi observées (résultats non présentés). Trois variants ont été retenus pour être clonés 2 fois puis amplifiés. Leurs caractéristiques ont été mentionnées dans les tableaux I et II : ils ont présenté la réactivité minimale avec l'Ac Mo 3115 et la réactivité maximale avec l'Ac Mo 2114. De plus la glycoprotéine HN (74 kDa) des 3 variants n'a pas été reconnue par l'Ac Mo 3115 en *Western Blot*,



**Fig 1.** Réactivité comparée des protéines HN des variants et du virus La Sota vis-à-vis de l'anticorps monoclonal 3115, en *Western-Blot*. Les protéines des souches virales purifiées : variants b23 (A), a25 (B), a16 (C) et La Sota (D) préalablement ajustées à une même concentration (25 µg par dépôt) ont été séparées par électrophorèse SDS-Page transférées sur papier de nitrocellulose, puis incubées avec soit l'Ac Mo 3115, soit un liquide d'ascite négatif, soit un sérum polyclonal de souris anti-NDV (S+), dilués au 1/100. Les chiffres figurant sur le côté droit sont exprimés en kDa.

alors que la protéine HN du virus d'origine a été reconnue dans les mêmes conditions (fig. 1).

Par ailleurs, les index de pathogénicité par voie intracérébrale des 2 variants testés ont été faibles ou nuls (tableau I).

#### ***Immunité conférée par les variants non inactivés***

Outre leur innocuité, les 3 variants non inactivés (a16, a25, b23) admin-

istrés par voie oculaire ont procuré, dans les conditions définies ci-dessus, une protection équivalente (différence non significative) à celle conférée par un vaccin classique La Sota, suite à une épreuve virulente, effectuée 17 j après la vaccination (tableau III), qui a produit, selon les critères de validation de l'essai, 100 % de mortalité chez 20 témoins éprouvés non vaccinés.

Les résultats des titrages d'anticorps réalisés chez les poulets précédents vaccinés avec les variants

**Tableau I.** Caractéristiques des variants obtenus par pression de sélection<sup>a</sup> par comparaison avec la souche virale d'origine.

Tests utilisés	Variants <sup>b</sup>				Témoin <sup>d</sup>
	La Sota <sup>c</sup>	a25	b23	a16	
IHA 3115 <sup>e</sup>	20480	< 10	< 10	10	< 10
ELISA 3115 <sup>f</sup>	0,313	0,020	0,020	0,032	0,020
ELISA 2114 <sup>f</sup>	0,161	0,158	0,397	0,070	0,018
Titre <sup>g</sup>	10 <sup>10,2</sup>	10 <sup>10,6</sup>	10 <sup>11,6</sup>	10 <sup>10,6</sup>	0
IPIC <sup>h</sup>	< 0,5 <sup>i</sup>	0,2	0,0	NF	0,0

<sup>a</sup> Dérivés de la souche La Sota résistant à la neutralisation par l'anticorps monoclonal 3115; <sup>b</sup> Multipliés en liquide allantoïque d'œufs embryonnés de poule EOPS; <sup>c</sup> Virus complet d'origine (souche vaccinale du commerce) multiplié comme décrit en b; <sup>d</sup> Liquide allantoïque, non infecté; <sup>e</sup> Inverse de la dilution la plus élevée de l'Ac Mo 3115 capable d'inhiber totalement 4 unités hémagglutinantes de chacune des souches virales indiquées. <sup>f</sup> DO 490 (630) nm; moyenne de 2 répétitions. <sup>g</sup> Le titrage a été réalisé sur œufs embryonnés de poule EOPS et est exprimé en DIE50/ml. <sup>h</sup> Index de pathogénicité par voie intracérébrale; Norme européenne d'agrément des vaccins de la maladie de Newcastle à vaccin vivant (Anonyme 1989).

**Tableau II.** Étude comparative des variants et de la souche virale d'origine à l'aide d'anticorps monoclonaux, selon la technique ELISA.

Anticorps monoclonaux	Vaccin La Sota <sup>a</sup>	Variants <sup>b</sup>			+
		a25	b23	a16	
2114	+	+	+	+	
1035	+	+	+	+	
3115	+	-	-	±	
1063	+	+	+	-	
1062	+	+	+	-	
3048	+	+	+	+	

<sup>a</sup> et <sup>b</sup> Cf Tableau I

**Tableau III.** Protection conférée par les variants non inactivés.

Vaccin <sup>a</sup>	Protection <sup>b</sup>
a25	16/16 <sup>c</sup>
b23	20/20
a16	16/16
Aucun <sup>d</sup>	0/20
La Sota <sup>d</sup>	20/20

<sup>a</sup> 10<sup>6,5</sup> DIE50/poulet EOPS de 3 semaines par voie oculaire; <sup>b</sup> Suite à une épreuve virulente effectuée par voie intramusculaire, 17 j après la primovaccination, avec la souche Ploufragan vélogène (10<sup>5</sup> DIE50/poulet); <sup>c</sup> Nombre de survivants normaux (n'ayant présenté ni symptômes, ni lésions)/nombre de poulets inoculés, après 17 j d'observation; <sup>d</sup> Vaccin du commerce à virus atténué.

**Tableau IV.** Anticorps induits par les variants vivants : comparaison avec les anticorps post-vaccinaux (vaccin La Sota atténué) et post-infectieux.

Test sérologique	Variant a25	Variant b23	Vaccin La Sota	Témoins non vaccinés
<i>Primovaccination<sup>f</sup></i>				
IHA	6,3-10,3 <sup>d</sup> 8,0 (22) <sup>e</sup>	6,3-9,3 8,2 (22)	6,3-9,3 8,2 (20)	2,3-3,3 2,8 (20)
ELISA 3115	0-5 2,2 (23)	0-4 2,1 (22)	6,3-11,3 8,6 (20)	0 0 (20)
ELISA 2114	1-7 3,9 (23)	1-6 4,0 (22)	6-10 7,6 (20)	<2 < 2 (20)
<i>Rappel de vaccination<sup>b</sup></i>				
IHA	5,3-8,3 7,7 (17)	6,3-8,3 7,3 (13)	NF	NF
ELISA 3115	3-7 4,5 (17)	3-9 4,8 (13)	NF	NF
ELISA 2114	5-9 6,5 (17)	5-8 6,5 (13)	NF	NF
<i>Primovaccination et épreuve<sup>c</sup></i>				
IHA	7,3-11,3 9,7 (14)	7,3-11,3 9,3 (17)	7,3-9,3 8,1 (20)	+ ... (f)
ELISA 3115	4,3-11,3 8,2 (14)	4,3-10,3 6,4 (17)	5,3-12,3 9,3 (20)	... (f)
ELISA 2114	7-12 9,3 (14)	9-12 10,1 (17)	5-10 8,5 (20)	... (f)

<sup>a</sup> Les titres en anticorps ont été mesurés 17 j après la vaccination avec les variants (21 j après la vaccination avec la souche La Sota), 10<sup>6,5</sup> DIE50/poulet EOPS de 3 semaines par voie oculaire.<sup>b</sup> Les titres en anticorps ont été mesurés 20 j après le rappel de vaccination, celui-ci étant effectué selon les conditions précitées au moment de la prise de sang mentionnée en (a); <sup>c</sup> Les titres en anticorps ont été mesurés 17 j après l'épreuve virulente réalisée 17 j après la primovaccination, avec la souche Ploufragan vélogène (10<sup>6</sup> DIE50/poulet); <sup>d</sup> log<sub>2</sub> du titre en anticorps minimal et maximal; <sup>e</sup> log<sub>2</sub> de la moyenne géométrique du titre (nombre de sérums); <sup>f</sup> Aucun survivant.

a25 et b23 ont été mentionnés dans le tableau IV. Suite à la primo-vaccination les titres d'anticorps, mesurés par les tests ELISA utilisant les Ac Mo 3115 et 2114, des poulets vaccinés avec les variants ont été inférieurs ( $P < 0,001$ ) (respectivement 2,2 et 2,1; 3,9 et 4,0) à ceux observés chez les poulets vaccinés avec le vaccin La Sota du commerce (8,6; 7,6). Il n'a pas été observé de différences selon le variant administré.

Suite au rappel de vaccination, il a été constaté, quel que soit le variant, une augmentation ( $P < 0,001$ ) des titres d'anticorps mesurés par les 2 tests ELISA (4,5 et 4,8; 6,5 et 6,5). Les titres d'anticorps mesurés par IHA n'ont pas été (NS) ou sont peu modifiés ( $P < 0,01$ ) (7,7 et 7,3) par rapport aux titres observés lors de la primovaccination (8,0 et 8,2).

L'épreuve expérimentale a accru ( $P < 0,001$ ) les titres d'anticorps chez les poulets préalablement vaccinés avec les variants, quel que soit le test utilisé (9,7 et 9,3; 8,2 et 6,4; 9,3 et 10,1). La réponse des poulets a été assez homogène (différence non significative ou peu significative,  $P < 0,05$ ) quelle que soit la souche variante utilisée en primovaccination.

Les titres d'anticorps révélés par IHA chez les poulets éprouvés, préalablement vaccinés avec un variant, ont été supérieurs (9,7 et 9,3,  $P < 0,001$ ) à ceux enregistrés chez les poulets préalablement vaccinés avec un vaccin La Sota classique (8,1). Alors que la distinction entre anticorps post-vaccinaux et postinfectieux n'a pas été ou a été peu significative ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,02$ ) lorsque les poulets ont reçu le vaccin classique La Sota (8,2 à comparer à 8,1, 8,6 à comparer à 9,3, 7,6 à comparer à 8,5), celle-ci a été évidente ( $P < 0,001$ ) par les tests ELISA, lorsque les poulets ont reçu le variant a25 comme vaccin (2,2 et 4,5 à comparer à 9,7; 3,9 et 6,5 à comparer à 9,3).

#### **Immunité conférée par le variant b23 inactivé**

Une protection, équivalente à celle procurée par un vaccin inactivé du commerce, a été observée (différence non significative), que le variant soit ou non adjuvé (tableau V).

Les titres d'anticorps obtenus avec le variant b23 adjuvé ont été supérieurs ( $P < 0,001$ ) à ceux observés avec le variant b23 non ad-

**Tableau V.** Protection conférée par le variant b23 inactivé.

Lot	Protection <sup>c</sup>
b23 <sup>a</sup>	20/20
b23 <sup>a</sup> + Adjuvant <sup>b</sup>	20/20
Aucun	0/20
Vaccin <sup>d</sup>	20/20

<sup>a</sup> Chaque poulet EOPS de 4 semaines a reçu par voie sous-cutanée une dose de virus équivalent à 10<sup>11,3</sup> DIE50 avant inactivation; <sup>b</sup> Adjuvant incomplet de Freund volume à volume; <sup>c</sup> Nombre de poulets survivants sans manifestations cliniques/nombre de poulets éprouvés, à l'issue de 3 semaines d'observation. L'épreuve a été réalisée 4 semaines après la vaccination avec la souche vélogène Ploufragan (10<sup>5</sup> DIE50/poulet); <sup>d</sup> Vaccin du commerce à virus inactivé 1 dose par poulet administrée par voie sous-cutanée.

juvé, quelle que soit la technique utilisée (7,6 à comparer à 3,7; 2,9 à comparer à 0; 7,4 à comparer à 2,5). Par rapport aux poulets vaccinés avec le vaccin du commerce, les poulets ayant reçu le variant b23 adjuvé ont présenté des taux d'anticorps réduits (2,9 à comparer à 8,6) ( $P < 0,001$ ) lorsqu'ils ont été mesurés par le test ELISA utilisant l'Ac Mo 3115; les poulets ayant reçu le variant b23 non adjuvé ont montré une réponse sérologique très diminuée, quel que soit le test ( $P < 0,001$ ) (3,7; 0 et 2,5 à comparer respectivement à 7,3; 8,6 et 6,6). Alors qu'il a été difficile de distinguer les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux chez les animaux vaccinés avec le vaccin du

commerce (différence non significative ou très peu significative,  $P < 0,05$ ), cette distinction est aisée ( $P < 0,001$ ) chez les poulets vaccinés avec le variant b23 adjuvé ou non, cela quelle que soit la technique utilisée (3,7 à comparer à 11,4; 0 à comparer à 9,4; 2,5 à comparer à 11,3 etc. (tableau VI).

### **Stabilité du variant b23**

Les taux d'anticorps détectés par les techniques IHA et ELISA utilisant l'Ac Mo 3115 ont été constants (différence NS) au cours des 3 à 4 premiers passages en série; il n'a donc pas été mis en évidence de cette manière, de modification de la protéine HN du virus variant au cours

**Tableau VI.** Anticorps induits par le variant b23 inactivé : comparaison avec les anticorps post-vaccinaux (vaccin La Sota inactivé) et post-infectieux.

Test sérologique	Variant b23 sans adjuvant	Variant b23 avec adjuvant	Vaccin La Sota	Témoins non vaccinés
<i>Vaccination<sup>a</sup></i>				
IHA	2-5 <sup>c</sup> (3,7) <sup>d</sup>	7-9 (7,6)	6,3-8,3 (7,3)	2-3 (2,4)
ELISA 3115	0-0 (0)	1-7 (2,9)	7,3-12,3 (8,6)	0 (0)
ELISA 2114	0-4 (2,5)	6-9 (7,4)	4,8 (6,6)	< 2 (< 2)
<i>Vaccination et épreuve<sup>b</sup></i>				
IHA	10,3-13,3 (11,4)	8,3-12,3 (10,3)	6,3-8,3 (7,5)	... <sup>e</sup>
ELISA 3115	8,3-11,3 (9,4)	6,3-11,3 (8,6)	7,3-10,3 (9,0)	... <sup>e</sup>
ELISA 2114	10-12 (11,3)	9-12 (10,8)	4-9 (7,4)	... <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Le titre en anticorps a été mesuré 27 j après l'administration du variant (28 j après la vaccination avec la souche La Sota), 10<sup>6,5</sup> DIE50/poulet par voie conjonctivale; <sup>b</sup> Le titre en anticorps a été mesuré 21 (23) j après l'épreuve virulente, effectuée avec la souche vélogène Ploufragan 10<sup>5</sup> DIE50/poulet, 4 semaines après la vaccination; <sup>c</sup> log<sup>2</sup> du titre en anticorps minimal et maximal; <sup>d</sup> log<sup>2</sup> de la moyenne géométrique du titre  $n = 20$ ; <sup>e</sup> Aucun survivant.

**Tableau VII.** Anticorps induits par le variant b23 soumis à des passages successifs chez des poulets EOPS de 3 à 5 semaines

Niveau de passage du virus	IHA	ELISA 3115	ELISA 2114
Premier <sup>a</sup>	7-9 <sup>g</sup> (7,2) <sup>d</sup>	1-7 (3,5)	4-8 (5,5)
Deuxième <sup>b</sup>	7-9 (8,1)	1-5 (3)	1-6 (3,7)
Troisième <sup>b</sup>	6-10 (7,9)	0-6 (3,3)	1-4 (2,3)
Quatrième <sup>b</sup>	5-9 (7,2)	NF	1-5 (1,9)
Cinquième <sup>b</sup>	3-4 (3)	NF	NF
Avant contamination	2-3 (2,8)	0 (0)	< 2 (< 2)

<sup>a</sup> Prises de sang effectuées 24 j après la vaccination réalisée par voie conjonctivale 10<sup>6,5</sup> DIE50/poulet;  
<sup>b</sup> Prises de sang effectuées 20 à 23 j après le début des mises en contact, celle-ci étant réalisées tous les 4 à 5 j entre  $P_n$  et  $P_{n+1}$ ; NF; <sup>c</sup>  $\log^2$  du titre en anticorps minimal et maximal; <sup>d</sup>  $\log^2$  de la moyenne géométrique du titre,  $n = 15$ . Non fait.

des passages. Dans le même temps, les taux d'anticorps détectés par la technique ELISA utilisant l'Ac Mo 2114 ont diminué ( $P < 0,001$ ) (tableau VII). Chez les animaux correspondant au 5<sup>e</sup> passage par contact, il n'était plus détecté d'anticorps par la technique IHA et des essais d'isolement du virus se sont révélés infructueux quel que soit l'organe prélevé (résultats non présentés). Les faits ont témoigné de l'échec du contagement à partir de ce passage.

## DISCUSSION

Pour l'obtention de variants, la souche La Sota a été choisie parce qu'elle est bien connue et a un plus large usage que la souche B<sub>1</sub>, étant utilisée aussi bien vivante qu'inac-

tivée dans plusieurs espèces aviaires domestiques : poule, dinde, perdrix, pintade (Meulemans, 1988) ainsi que pigeon.

Des variants résistants à la neutralisation par l'anticorps monoclonal 3115 ont été obtenus. Ils présentent une modification de la protéine HN telle qu'ils ne se lient plus à l'anticorps monoclonal 3115 alors qu'ils ont conservé par rapport au virus d'origine d'une part les propriétés d'hémagglutination, d'autre part la capacité de liaison avec l'Ac Mo 2114, spécifique des Paramyxovirus de type 1 (PMV1) ou NDV. À notre connaissance, il n'a pas été décrit de variants présentant ces caractéristiques dans la littérature. La nature de la mutation au niveau génomique n'a pas encore été déterminée avec certitude. Le séquençage de variants résistants à la neutralisa-

tion des Ac Mo dénommés : 21, 14, 4D6 qui possèdent des propriétés biologiques identiques à celles de l'Ac Mo 3115 (Jestin *et al*, 1989a), a montré que la substitution était limitée à un seul acide aminé situé en position 495 (Gotoh *et al*, 1988) ou en position 345 ou 347 (Yusoff *et al*, 1988) de la protéine HN.

Les variants a25 et b23 ont été les plus étudiés; le variant a16 se liant très faiblement avec l'Ac Mo 3115 et trop faiblement avec l'Ac Mo 2114, (tableau I) a été écarté.

Les variants a25 et b23 possèdent un IPIC inférieur à la norme européenne de 0,5, relative aux vaccins à virus vivant de la maladie de Newcastle (Anonyme, 1989). L'emploi sur le terrain de ces variants vivants ou inactivés est donc tout à fait envisageable, de ce point de vue. En outre, ils permettent expérimentalement de différencier les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux, qu'ils soient vivants ou inactivés, grâce à la mise en œuvre en parallèle de 2 tests ELISA bloquants utilisant chacun un anticorps monoclonal différent. À l'avenir si l'un de ces variants fait l'objet d'un transfert industriel, il serait souhaitable d'harmoniser davantage les paramètres techniques de ces tests. Les améliorations devraient avoir pour objectif prioritaire de conjuguer l'Ac Mo 2114 à la peroxydase, et si possible de rechercher une souche virale commune pour sensibiliser les plaques. Cependant, compte tenu du titre ELISA plus faible (environ  $1 \log_{10}$ ) de l'Ac Mo 2114 par rapport à l'Ac Mo 3115, il n'est pas certain que le conjugué obtenu ait la qualité requise; en outre le choix d'une souche virale destinée à sensibiliser les plaques nous paraît limité, pour

des raisons de sécurité, aux souches lentogènes présentant les IPIC les plus bas (telles les souches B1 et Ulster 2C utilisées présentement). Cette dernière a permis d'optimiser le test ELISA utilisant l'Ac Mo 2114; les possibilités d'emploi pour le test ELISA utilisant l'Ac Mo 3115 seraient à déterminer.

Il est troublant de constater le parallélisme des réponses en anticorps révélées par l'un et l'autre des 2 tests ELISA alors que, comme cela a déjà été rappelé, ces anticorps sont différents et la réactivité des variants a25 et b23 à l'égard de l'Ac Mo 2114 n'est pas altérée. S'il est bien établi que l'Ac Mo 3115 reconnaît la protéine HN du virus, la spécificité de l'Ac Mo 2114 est inconnue. Compte tenu de l'incapacité de cet anticorps à inhiber quelque activité biologique du virus, il est envisagé que cet anticorps reconnaît une protéine interne telle que la protéine membranaire (M), ou la nucléocapside (NP) ou la polymérase (P) ou la «large» protéine (L). De plus Nishikawa *et al* (1987), ont montré qu'il existait sur chacune des 3 premières protéines mentionnées des épitopes très conservés au sein des souches NDV, comme cela est le cas pour l'épitope reconnu par l'Ac Mo 2114. Cependant Abenes *et al*, (1986b) ont mis en évidence des Ac Mo anti HN n'inhibant aucune propriété biologique connue du virus (Ac Mo 176/1, 310/1, 410/1, 468/2); mais ces Ac Mo reconnaissent des épitopes qui sont, soit conservés parmi tous les Paramyxovirus aviaires, soit absents sur un certain nombre de PMV1, ce qui ne correspond pas au spectre de reconnaissance de l'Ac Mo 2114. On note aussi, qu'exceptionnellement, les ré-

ponses détectées par les 2 tests ELISA divergent consécutivement à la primovaccination effectuée avec la variante b23 adjuvée. Ce phénomène n'est pas expliqué actuellement.

Il convient aussi de définir les limites de l'utilisation de ces variants. Il reste à apprécier leur degré de pathogénicité résiduelle éventuelle pour le poussin, la souche La Sota d'origine administrée par aérosol au poussin d'un j pouvant occasionner de la mortalité (Meulemans, 1988). À cet égard la souche variante b23 devrait présenter une très bonne innocuité. Meulemans *et al* (1987) ont également obtenu un variant HN de la souche Italian (résistant à la neutralisation d'un Ac Mo anti HN : 8 C11, reconnaissant un épitope différent du nôtre) (Jestin *et al*, 1989a; Yusoff *et al*, 1988) qui présentait un index de pathogénicité par voie intraveineuse diminué par rapport à la souche d'origine. Par ailleurs, un rappel de vaccination occasionne une montée significative des taux d'anticorps détectés par le test ELISA 3115. S'agit-il d'une réversion d'une fraction de la population virale variante favorisée par l'absence d'anticorps spécifiques de l'épitope reconnu par l'Ac Mo 3115 ? Mais l'essai consistant à effectuer des passages en série, par contact, du variant b23 aurait dû révéler une augmentation des taux d'anticorps mis en évidence par le test ELISA 3115, ce qui n'a pas été le cas. L'épitope modifié des virus variants induit-il des anticorps capables de rentrer légèrement en compétition avec l'Ac Mo 3115 dans notre test ELISA ? Auquel cas il est nécessaire d'avoir déterminé quel est le niveau maximal de compétition (en analysant des sérums provenant de volailles con-

ventionnelles ayant reçu un programme de vaccination complet qui reste à préciser) et si ce niveau de compétition est acceptable.

L'emploi des variants vivants pose aussi le problème de la difficile maîtrise de leur stabilité génétique. En effet étant donné la mutation très ponctuelle obtenue occasionnant vraisemblablement un seul changement d'acide aminé, comme cela a été précédemment discuté, les variants pourraient réverser et reprendre les caractéristiques de la souche d'origine.

L'objectif de cet essai consistait donc à tenter d'évaluer les modifications des souches variantes qui pouvaient résulter de passages par contact en série sur l'animal. C'est pourquoi il avait été prévu, d'une part de comparer les réponses sérologiques au cours des passages, d'autre part de comparer au variant initialement administré, les variants excrétés au 5<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> passages; un rang de passage au moins égal à 5 nous paraissant significatif. Or le variant b23 a présenté une diffusibilité diminuée par rapport aux souches classiques, puisqu'il n'a pas été possible de réussir plus de 4 passages en série; les mises en contact étaient réalisées au moment du pic présumé d'excrétion des souches classiques : soit 4-5 j après la contamination (Asdell et Hanson, 1960; Beard et Easterday, 1967; Sinha *et al*, 1954). Parallèlement, sous réserve de confirmation, le test ELISA 2114 pourrait être un indicateur du degré de multiplication du virus dans l'organisme.

La portée de ce premier essai est donc limitée. Néanmoins cet essai n'a pas été renouvelé car l'usage de

variants inactivés nous paraît plus sûr. Il est en effet plus facile de maîtriser au laboratoire la stabilité des souches variantes, en maintenant par exemple, lors de chaque nouvelle multiplication, la pression de sélection, c'est-à-dire en ajoutant l'Ac Mo 3115 au préalable. Néanmoins, il reste à optimiser une préparation inactivée adjuvée permettant d'obtenir une durée de protection maximale, tout en conservant la possibilité de différencier les animaux ainsi vaccinés par rapport aux autres.

En attendant un vaccin recombinant NDV mis au point et commercialisé, une fois que les problèmes liés au choix d'un vecteur adapté seront levés (Meulemans *et al*, 1988), il est déjà possible de différencier quantitativement les anticorps post-vaccinaux des anticorps post-infectieux. Il reste à définir l'intérêt pratique et commercial de l'utilisation éventuelle de tels variants à plus grande échelle.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Messieurs Y Morin, L Le Coq, G Jarnet, E Quintin, L Le Moal pour leur excellent appui technique. Leurs remerciements s'adressent également à Monsieur G Somme (CLONATEC) pour le marquage de l'anticorps monoclonal 3115 à la peroxydase.

## RÉFÉRENCES

- Abenes GB, Kida H, Yanagawa R (1986a) Antigenic mapping and functional analysis of the F protein of Newcastle disease virus using monoclonal antibodies. *Arch Virol* 90, 97-110
- Abenes GB, Kida H, Yanagawa R (1986b) Biological activities of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus. *Jpn J Vet Sci* 48, 353-362
- Alexander DJ (1988) Newcastle disease diagnosis. In: *Newcastle disease* Alexander DJ (ed). Kluwer acad publ, Boston, (Developments in Veterinary Virology), 147-160
- Anonyme (1989) *Vaccinum pseudopestis aviariae vivum cryodessicatum*. In: *Pharmacopée Européenne* (Conseil de l'Europe ed) 2nd Ed 119 Maisonneuve SA, Ste Ruffine, 450/1-450/4
- Asdell MK, Hanson RP (1960) Sequential changes in the titer of Newcastle disease virus in tissues. A measure of the defense mechanism of the chicken *Am J Vet Res* 21, 128-132
- Beard CW, Easterday BC (1967) The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. *J Infect Dis* 117, 55-70
- Gotoh B, Sakaguchi T, Nishikawa K, Inocencio NM, Hamaguchi M, Toyoda T, Nagai Y (1988) Structural features unique to each of the three antigenic sites on the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Virology* 163, 174-182
- Iorio RM, Bratt MA (1985) Selection of unique antigenic variants of Newcastle disease virus with neutralizing monoclonal antibodies and anti-immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7106-7110
- Iorio KM, Borgman JB, Glickman RL Bratt MA (1986) Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 67, 1393-1403
- Jestin V, Cherbonnel M, Morin M, Guittet M, Bennejean G (1989a) Characterization of french avian paramyxovirus type I (PMV1) isolates with a panel of monoclonal antibodies to the Ploufragan strain of Newcastle disease virus. *Arch Virol* 105, 189-198
- Jestin V, Cherbonnel M, Bennejean G (1989b) An ELISA blocking test using a peroxydase-labelled anti-HN monoclonal antibody for the specific titration

- of antibodies to avian paramyxovirus type 1 (PMV1) *Arch Virol* 105, 199-208
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680-685
- Meulemans G, (1988) Control by vaccination. In : *Newcastle disease*. Alexander DJ (ed). Kluwer acad publ, Boston (Developments in Veterinary virology), 318-332
- Meulemans G, Gonze M, Carlier MC, Petit P, Burny A, Long Lê (1987) Pathogenicity of antigenic variants of Newcastle disease virus, Italian strain selected with monoclonal antibodies. *Ann Rech Vet* 18, 371-374
- Meulemans G, Letellier C, Carlier M, Burny A (1988) Newcastle disease F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol* 17, 821-827
- Neyt C, Geliebter J, Slaoui M, Morales D, Meulemans G, Burny A, (1989) Mutations located on both F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> subunits of the Newcastle disease virus fusion protein confer resistance to neutralization with monoclonal antibodies. *J Virol* 63, 952-954
- Nishikawa K, Isomura S, Suzuki S, Watanabe E, Hamaguchi M, Yoshida T, Nagai Y, (1983) Monoclonal antibodies to the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. Biological characterization and use for strain comparisons. *Virology* 130, 318-330
- Nishikawa K, Hanada N, Morishima T, Yoshida T, Hamaguchi M, Toyoda T, Nagai Y (1987) Antigenic characterization of the internal proteins of Newcastle disease virus by monoclonal antibodies. *Virus Res* 7, 83-92
- Quint W, Gielkens A, Oirschot JV, Berns A, Cuypers HT (1987) Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus : a new generation of "live" vaccines. *J Gen Virol* 68, 523-534
- Russell PH (1984) Newcastle disease virus : the effect of monoclonal antibody in the overlay on virus penetration and the immunoselection of variants. *J Gen Virol* 65, 795-798
- Samson ACR, Russell PH, Hallam SE (1985) Isolation and characterization of monoclonal antibody-resistant mutants of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 66, 357-361
- Samson ACR, Nesbit M, Lyon AM, Meulemans G (1988) Identification of haemagglutinin-neuraminidase antibody binding sites by Western blot analysis of antibody-resistant mutants and partial digest fragments of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 69, 473-480
- Sinha SK, Hanson RP, Brandly CA (1954) Aerosol transmission of Newcastle disease in chickens. *Am J Vet Res* 15, 287-292
- Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H, Nagai Y, (1988) Identification of aminoacids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralisation. *J Virol* 62, 4427-4430
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354
- Van Oirschot JT, Rziha HJ, Moonen PJLM, Pol JMA, Van Zaane D (1986) Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or injected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J Gen Virol* 67, 1179-1182
- Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Emmerston PT, Samson ACR (1988) Mapping of three antigenic sites on the haemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus. *Virus Res* 11, 319-333