

毕友坤, 屈阳, 卫巧林, 等. 新城疫病毒强毒株 F48E9 致病性细化分型的鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50 (2): 91-96.

Bi Y K, Qu Y, Wei Q L, et al. Identification of pathogenic refined classification of the virulent strain F48E9 of the Newcastle disease virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 50 (2): 91-96.

新城疫病毒强毒株 F48E9 致病性细化分型的鉴定

毕友坤, 屈阳, 卫巧林, 王文彬, 赵杰, 金忠元, 张淑霞, 王兴龙, 杨增岐, 萧飒*

(西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了确证我国标准速发型新城疫强毒株 F48E9 致病性的细化分型, 分别采用泄殖腔涂抹、泄殖腔注射、点眼滴鼻和静脉注射 4 种感染途径, 用高、低 2 种剂量对 SPF 鸡进行感染, 综合分析临床症状和病理变化。结果显示: 各组均出现典型神经症状, 并且伴随呼吸道症状和下痢, 其中高剂量组尤其是静脉注射途径, 病程较短, 出现明显神经症状后 1~2 h 死亡, 病理变化不明显; 低剂量组发病平缓, 神经症状呈明显的渐进性, 其中以点眼滴鼻途径最为明显; 各感染途径剖检观察到明显的脑部及肠道出血; 综合分析判定 F48E9 株为嗜神经型速发型强毒。同时, 针对强毒株致病性的细化分型, 建议采取点眼滴鼻途径和低剂量方式, 综合分析临床症状和病理变化进行鉴定。对速发型新城疫病毒的细化分型鉴定能够进一步为新城疫的鉴别诊断, 病毒的组织嗜性、致病机理研究提供重要的基础依据。

关键词: 新城疫病毒; F48E9 株; 致病型; 嗜神经型

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2018)02-0091-06

Identification of pathogenic refined classification of the virulent strain F48E9 of the Newcastle disease virus

BI Youkun, QU Yang, WEI Qiaolin, WANG Wenbin, ZHAO Jie, JIN Zhongyuan,

ZHANG Shuxia, WANG Xinglong, YANG Zengqi, XIAO Sa*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The strain F48E9 of the Newcastle disease virus is a standard velogenic virus in China, but there is little report about its refined pathotypic classification. In order to verify the classification, specific pathogen-free chickens were infected with the F48E9 strain at high and low doses through cloacal swab, cloacal injection, ocular-nasal and intravenous routes, respectively. Then, clinical signs and pathogenic lesions were evaluated. The results showed that all the experimental groups presented typical neurological signs accompanied with respiratory symptoms and slight diarrhea. In the high dose groups, especially by the intravenous route, the course of disease was short and the birds died rapidly one to two hours after neurological symptoms appeared, but the pathological changes in them were not obvious. In the low dose groups, mild neurological signs were gradually progressing and most obviously in the ocular-nasal route. The hemorrhage in the brains and intestines was evidently observed in all the inoculation routes. In conclusion, the pathotype of F48E9 strain is velogenic and neurotropic. The ocular-nasal route and low dose for virus infection are proposed to assess clinical signs and pathogenic lesions for identifying the refined pathotype of velogenic virus. This study may provide an important basis for differential diagnosis, tissue tropism and pathogenesis of the Newcastle disease virus.

Key words: Newcastle disease virus; F48E9 strain; pathotype; neurotropic

新城疫又称亚洲鸡瘟、伪鸡瘟, 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus) 引起的一种禽类呼吸道、消化道和神经系统损伤为主要特征的急性、高度致死性传染病, 给全球养禽业造成了巨大的经济损失^[1-2]。新城疫病毒属于副黏病毒科 (Paramyxoviridae), 禽

副黏病毒属 (Avulavirus)。新城疫病毒只有 1 个血清型, 但各毒株之间的毒力存在较大差异^[3-4]。依据鸡感染新城疫病毒后的临床症状和病理变化主要分为 3 个致病型 (pathotype): 缓发型或低毒型 (lentogenic); 中发型或中毒型 (mesogenic); 速发型或强毒型 (velogenic)。而速发型又细化分为: 速发嗜内脏型 (velogenic viscerotropic), 简称嗜内脏型; 速发嗜神经型 (velogenic neurotropic), 简称嗜神经型^[5]。新城疫病毒的主要 3 种致病型的鉴定, 一般采用鸡胚平均致死时间 (MDT)、1 日龄雏鸡脑内致病

收稿日期: 2017-07-14; 修回日期: 2017-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572533)

作者简介: 毕友坤 (1989-), 男, 硕士研究生

* 通信作者: 萧飒, 教授, 主要从事新城疫病毒相关研究, E-mail: saxiao@nwfu.edu.cn.

指数 (ICPI) 和 6 周龄鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 综合指标进行毒力鉴定^[6-8]。通过致病型的鉴定可以区分病毒株毒力的强弱,对新城疫的临床诊断、疫苗研制和防控具有重要意义。嗜内脏型和嗜神经型的细化鉴定传统上主要是通过泄殖腔涂抹的方法对易感家禽进行感染^[6-9],以消化道症状、神经症状、呼吸症状和胃肠道出血等临床病理上的显著性特征为主要判定指标^[10-11]。对速发型新城疫病毒的细化分型鉴定能够进一步为新城疫的鉴别诊断,病毒的组织嗜性、致病机理研究提供重要的基础依据。

新城疫病毒 F48E9 株为我国于 1948 年从暴发新城疫的养鸡场分离获得,通过测定其 MDT、ICPI 和 IVPI 鉴定其为速发型强毒株^[12-13]。由于 F48E9 株长期以来被广泛应用于我国新城疫研究的各类攻毒试验,因此将其作为我国公认的标准强毒株^[14]。但是 F48E9 株作为速发型强毒株的致病性细化分型至今未见具体的研究报道。目前,在新城疫致病型研究过程中,国际动物卫生组织 (OIE) 并无标准化的操作流程。因此,本研究计划通过采取不同的感染途径和剂量,观察分析感染 SPF 鸡的临床症状和病理变化以明确 F48E9 株细化的致病性类型,并为速发型强毒株的细化分型鉴定提供参考方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新城疫病毒 F48E9 株购自中国兽药监察所; 4 周龄 SPF 白来航鸡 96 只,购自济南赛斯家禽科技有限公司; 9 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,购自陕西杨凌绿方生物工程有限公司; DF-1 细胞为美国模式培养物集存库 (ATCC) 来源; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 F48E9 毒株的扩增

将 F48E9 毒株用 PBS 进行 1 : 10 000 稀释,经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,0.2 mL/枚,接种后于 37 °C 培养,24 h 照胚,弃去死亡鸡胚,48 h 收胚,4 °C 保存过夜,收集含有病毒的尿囊液,3 000

r/min 离心 5 min,取上清于 4 °C 保存。

1.3 病毒滴度的测定

DF-1 细胞以每孔 1×10^5 细胞数铺于 12 孔细胞板,在 37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱培养,至细胞长满培养板。取含有病毒的尿囊液,用 DMEM 培养液依次进行 10 倍梯度稀释至 10^{-8} 。弃去细胞培养孔的培养基,用 PBS 清洗 3 遍,每孔加入稀释后的病毒液 250 μ L,每个稀释度 3 个重复,于细胞培养箱内孵育 1 h,每 15 min 轻摇 1 次。弃去病毒液,PBS 清洗 3 次,加入含有 1% 甲基纤维素、2% FBS 的 DMEM 培养液 1 mL/孔,细胞培养箱内孵育 4 d。弃去培养液,PBS 清洗 3 遍,100% 甲醇固定 30 min,水洗后加入 1 mL 0.1% 结晶紫水溶液,处理 25 min,水洗后风干,噬斑计数,计算病毒噬斑滴度 (PFU/mL)。

1.4 动物感染试验

96 只 3 周龄 SPF 鸡随机分为 3 组: 高剂量组、低剂量组和 PBS 空白对照组,各 32 只,每种感染途径 8 只 (表 1)。所有动物试验均在生物安全隔离器中进行。每 12 h 观察临床症状并记录 1 次,发现病鸡死亡立刻进行解剖,观察并记录相应组织器官的病理变化。

表 1 新城疫病毒感染途径及剂量 PFU/mL

接种途径	高剂量组	低剂量组	空白对照
静脉注射	5×10^7	5×10^2	0
点眼滴鼻	5×10^7	5×10^2	0
泄殖腔涂抹*	5×10^7	5×10^2	0
泄殖腔注射	5×10^7	5×10^2	0

注: 除泄殖腔涂抹组外每组感染剂量 0.2 mL。* 用棉签蘸取病毒液。

1.5 临床症状和病理变化评价

各组综合临床症状、神经症状以及病理变化评价标准见表 2。

表 2 临床症状和病理变化评价

评分	综合临床症状的评价	神经症状的评价	病理变化的评价
0	状态良好,饮食饮水均正常	未见任何神经症状	未见明显病理变化
1	精神沉郁,下痢,缩颈,强烈刺激有反应	出现精神沉郁,不喜走动的症状	有轻微的充血、出血
2	出现震颤,流涎,瘫痪,卧地不起,强烈刺激反应不明显	出现头颈扭曲、翅膀下垂、卧底	充血出血较明显,易于观察
3	死亡	瘫痪、震颤,角弓反张等神经症状	有明显的出血斑、出血点,化脓性炎症
4		死亡	

注: 以每组评分的平均值进行评价。

1.6 病毒载量测定

对死亡鸡立刻进行解剖, 采取脑、气管、肝脏、脾脏、肺脏、肌胃、腺胃、十二指肠、盲肠扁桃体、法氏囊各器官的部分组织称重, 并置于离心管中, 加入等量的 PBS 含双抗终浓度为 3 000 U, 匀浆器匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。DF-1 细胞铺于 96 孔细胞培养板, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养过夜, 弃掉培养基, PBS 清洗 3 次, 将上述准备的组织病毒原液用 DMEM 培养液进行 10 倍梯度稀释 (10⁻¹~10⁻⁸), 每个稀释度分别接种 DF-1 细胞板, 同时设置无病毒液的细胞孔作为空白对照。病毒吸附 1 h 后, 加入维持培养基 (1% FBS+DMEM), 然后置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养 3 d, 观察细胞病变, 并按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀, 试验重复 3 次。

2 结果

2.1 病毒滴度测定

蚀斑计数结果显示, 病毒滴度为 1.7×10^7 PFU/mL。

2.2 高剂量感染组临床症状和病理变化

2.2.1 临床症状

各试验组感染高剂量病毒后出现的综合临床症状发展过程如下: 感染 24 h 左右, 表现精神沉郁、食欲减退, 随后出现张口呼吸、缩颈、昏睡等症状, 对强烈刺激有反应, 除静脉注射组外, 其他 3 组在 60 h 左右, 部分鸡开始出现头颈震颤、流涎、阵发性痉挛、腿麻痹、倒向一侧, 发病过程中未出现下痢现象。其中静脉注射组发病急, 表现的临床症状快于其他 3 组 24 h 左右 (图 1)。仅从神经症状分析, 4 种感染途径组均出现了典型的神经症状, 静脉注射组早于其他 3 组 24 h 左右, 此结果与上述综合临床症状相似; 其他 3 组之间出现神经症状的时间相差约 12 h, 快慢依次为点眼滴鼻、泄殖腔注射和泄殖腔涂抹 (图 2)。临床症状和神经症状统计分析表明, 各试验组和空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 静脉注射组和其他试验组之间差异显著 ($P < 0.05$), 其他组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

各试验组死亡率均为 100%, 静脉注射组死亡最快, 在感染后 72 h 全部死亡, 而其他各组死亡率相似, 在 108 h 全部死亡 (图 3)。未感染对照组鸡群均无任何临床症状且全部存活。

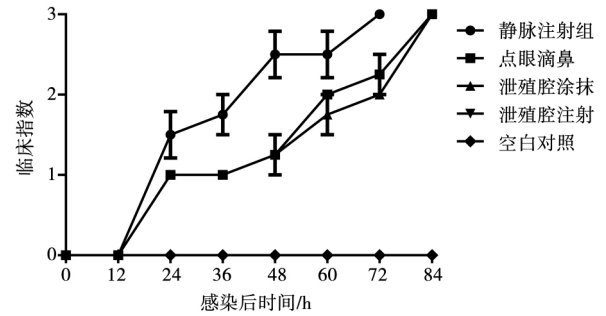


图 1 高剂量组临床症状评价

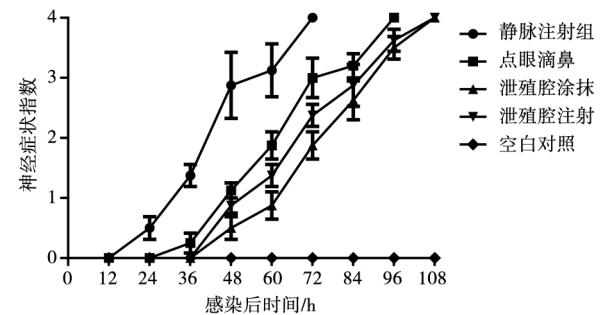


图 2 高剂量组神经症状评价

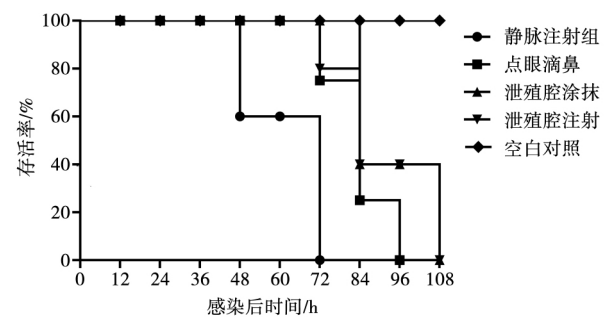


图 3 高剂量组致死率情况

2.2.2 病理变化

静脉注射组和点眼滴鼻组死亡剖检发现全部鸡十二指肠均有出血现象, 脑部出现轻微的炎症和点状出血, 盲肠扁桃体轻微肿大。此外, 泄殖腔注射组和泄殖腔涂抹组所有鸡直肠有明显的出血、坏死, 部分鸡气管出现轻微充血, 其他的组织器官病理变化不明显。病理变化评分见图 4。

2.2.3 病毒载量测定

病毒载量测定发现, 各组织器官均有一定的病毒滴度, 其中, 点眼滴鼻组气管病毒滴度最高, 静脉注射组在脾脏、肺脏、气管、法氏囊等器官具有较高的病毒滴度, 泄殖腔涂抹组和注射组在法氏囊、盲扁和小肠具有较高的病毒滴度 (图 5)。

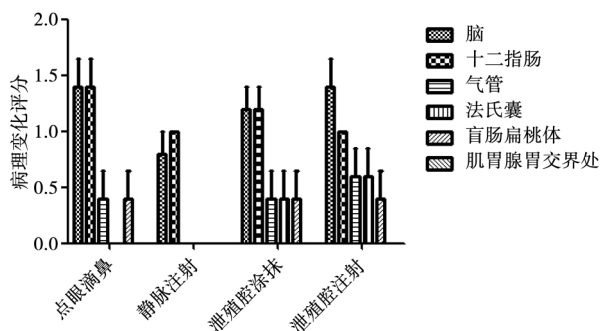


图4 高剂量组病理变化

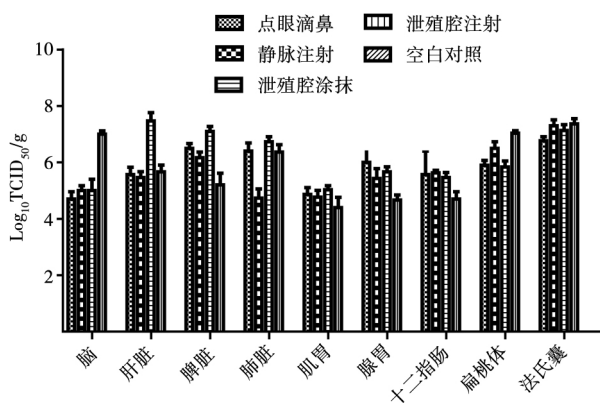


图5 高剂量组器官病毒载量

2.3 低剂量感染组临床症状和病理变化

2.3.1 临床症状

各组鸡群感染低剂量病毒后综合临床症状发展过程为: 36 h 左右鸡群开始表现为精神萎靡, 咳嗽、下痢, 随后病禽表现呆立, 不愿走动, 静脉注射组和泄殖腔涂抹组在 84 h 左右, 点眼滴鼻组在 132 h 左右, 泄殖腔注射组在 204 h, 鸡群出现典型的神经症状, 如, 歇性震颤, 瘫痪等。其中静脉注射组发病急、病程短, 泄殖腔涂抹组最先发病, 但是表现出明显临床症状比前者晚 12 h 左右, 另外, 二者表现出临床症状早于其他 2 组 48~72 h, 剩余 2 组病情发展较为平缓, 以泄殖腔注射组病程最长 (图 6)。神经症状分析, 试验各组皆出现了典型的神经症状, 其中静脉注射组最早出现, 泄殖腔涂抹组次之, 二者早于点眼滴鼻组 48 h 左右, 泄殖腔注射组 96 h 左右; 剩余 2 组神经症状呈现渐进性, 易于观察, 二者表现出明显的神经症状时间相差 48 h 左右, 点眼滴鼻组早于泄殖腔注射组 (图 7)。临床症状和神经症状统计分析表明, 各试验组和空白对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 静脉注射组、泄殖腔涂抹组和其他试验组之间差异显著 ($P < 0.05$), 点眼滴鼻组和泄殖腔注射组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。

各试验组死亡率均为 100%, 其中, 静脉注射组

和泄殖腔涂抹组病情发展较快, 120~192 h 全部死亡, 相比而言, 另外 2 组鸡群死亡高峰期在感染后的 6~7 d, 泄殖腔涂抹组病程最长, 直到第 10 天鸡群才全部死亡 (图 8)。未感染对照组鸡群均无任何临床症状且全部存活。

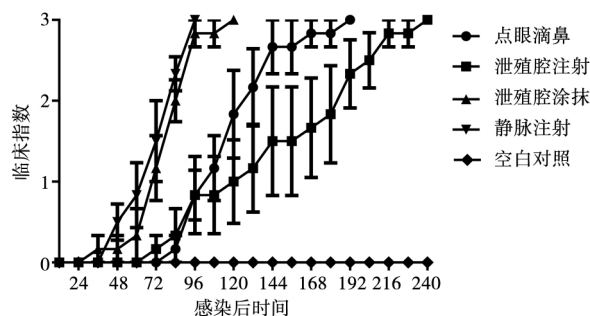


图6 低剂量组临床症状评价

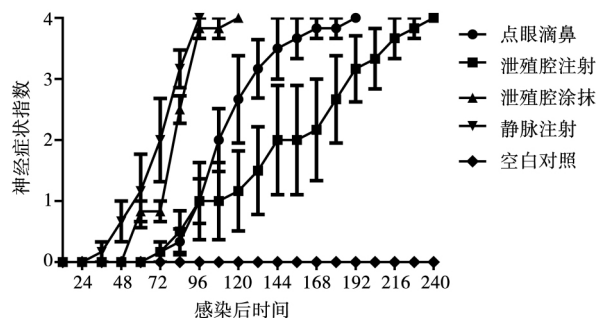


图7 低剂量组神经症状评价

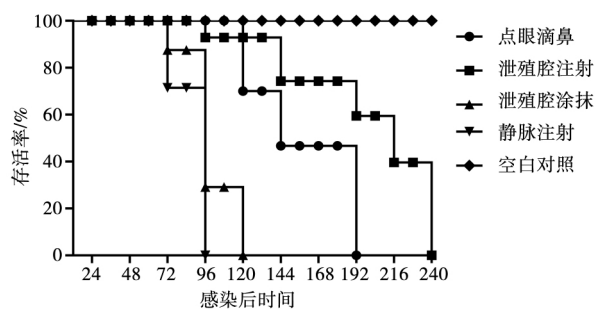


图8 低剂量组致死率情况

2.3.2 病理变化

死亡后剖检发现各组鸡群脑部均出现充血, 出血及化脓性炎症, 十二指肠明显出血, 部分鸡气管轻微性出血, 盲肠及扁桃体充血肿大。除去静脉注射组外, 其余各组大部分鸡腺胃乳头及肌腺胃交界处点状出血, 气管表现轻微充血, 另外, 泄殖腔涂抹组和泄殖腔注射组直肠有非常明显的出血性病变。各组组织病变评分见图 9。

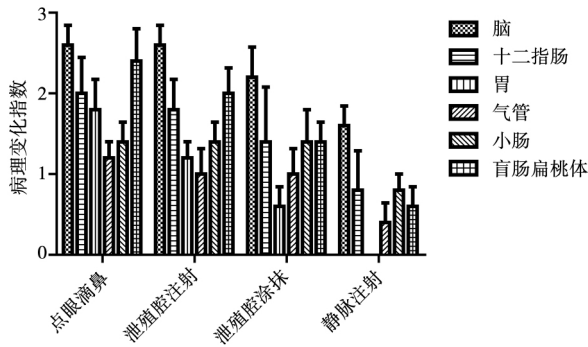


图 9 低剂量组病理变化

2.3.3 病毒载量测定

病毒载量试验结果表明, 各试验组器官均具有较高的病毒滴度, 其中以法氏囊、肝脏和脾脏最高 (图 10)。

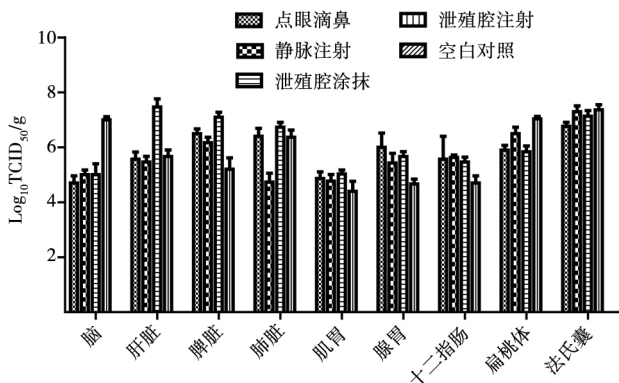


图 10 低剂量组器官病毒载量

3 讨论

新城疫是危害全球养禽业的主要传染病之一, 新城疫病毒强毒株感染是造成大规模新城疫暴发的根源^[15]。由于不同速发型强毒株引起家禽的临床症状和病理特点存在一定的差异, 又将速发型进一步细化分型: 传统上, 如果发病过程中出现严重下痢, 同时伴随有严重的消化道出血, 则判定为嗜内脏型^[16]; 如果出现典型的神经症状, 伴随有呼吸道症状, 下痢症状不明显或程度较轻, 消化道轻微出血或无出血, 则判定为嗜神经型^[17-18]。嗜内脏型强毒株感染 SPF 鸡, 引起的急性病例一般表现为精神高度沉郁, 随着病情发展, 病禽呼吸急促、下痢、口鼻流酸臭味液体, 最终衰竭死亡; 其病理变化呈现腺胃乳头点状出血、肠道黏膜出血、盲肠扁桃体肿大、泄殖腔黏膜点状或片状出血^[11], 最终引起严重的系统性疾病, 以消化道严重出血性病变为主要特征, 死亡率较高^[19-20]。嗜神经型强毒株常引起病禽起初表现精神

沉郁, 伴随有呼吸道症状, 发病 1~2 d 后出现神经症状, 如扭颈、站立不稳或卧地不起, 死前出现瘫痪, 阵发性痉挛等, 发病过程中下痢不明显, 死亡率高低不等^[17-21]; 病理变化观察脑部有充血、出血、炎症反应, 气管有卡他性炎性渗出, 严重时呈现出血, 腺胃、盲肠及小肠黏膜出血不如嗜内脏型引起的病变明显^[10]。但是, 典型的嗜内脏型强毒株也会有轻微神经症状, 如 CA1083 感染鸡后 2 d 左右表现极度精神沉郁^[22]; Australia/9809 株出现头部震颤^[16]。典型的标准嗜神经型强毒株如 Texas GB 株感染鸡除表现出典型的神经症状, 也出现了下痢和肠道出血^[16-17]。病毒载量试验结果表明, 高剂量组和低剂量组各组织器官均出现了一定的病毒滴度, 其中以法氏囊、肝脏、脾脏等最高, 综合病理变化观察和病毒载量试验, 具有明显病理变化的组织器官并不具有最高的病毒滴度, 如脑; 而具有较高病毒滴度的组织器官病理变化也不是特别明显, 如法氏囊 (数据未显示), 结果表明器官病毒载量在 $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 以下时, 其病理变化和病毒滴度没有直接关系。因此, 要对速发型强毒株新城疫病毒进行细化分型鉴定, 应该以病症所表现的显著性或严重程度进行划分。本试验发现 F48E9 株能够引起典型神经症状, 同时伴随有明显的呼吸道症状, 出现了一定程度的下痢, 而且在低剂量组中各途径出现了较明显的肠道出血, 但是, 各试验组病理变化情况不统一, 与典型的嗜神经型强毒株如 Texas GB 株引起的症状和病理变化比较一致, 因此, 将其判定为嗜神经型。

速发型新城疫强毒株的细化分型鉴定涉及病毒的感染途径和病毒剂量。传统常用的感染方法是泄殖腔涂抹, 此方法直接将病毒接于肠道, 容易快速引起显著的消化道症状, 如严重下痢, 对于嗜内脏型的强毒株易于判断; 如果消化道症状轻微, 而神经症状显著, 并可能伴随有呼吸道症状, 则判定为嗜神经型^[6,9], 但是该方法会对肠道造成一定的损伤, 并且病毒的感染剂量无法确定。另外, 也有采用其他感染途径如点眼滴鼻^[10,16,19]和喷雾^[19]进行鉴定或辅助判定。本研究除采用传统的泄殖腔涂抹方法外, 还采用了 3 种感染途径: 泄殖腔注射, 对肠道造成的损伤较小, 且能够精准的控制病毒剂量; 点眼滴鼻, 该途径为常用的接种方法, 对机体造成的刺激较小; 静脉注射, 病毒直接进入血液循环, 鸡群能够较快地表现出临床症状。病毒感染剂量的选择, 除泄殖腔涂抹方式无法定量以外, 大多数研究报道均使用 $10^5 \sim 10^6 \text{EID}_{50}$ 中等剂量^[10-23]。本研究则采取差异性较大的高、低 2 种剂量用于分析剂量因素是否会影响病毒致病性的不同。试验发现低剂量组病理变化比高剂量组明

显,可能主要是由于高剂量组接毒量高,没有造成病理变化的积累就引起了鸡群的快速衰竭死亡,而且低剂量组中的点眼滴鼻途径和泄殖腔注射途径发病平缓,神经症状呈现明显的渐进性,但是,低剂量组中的泄殖腔注射组病程较长,可能是在接毒后,毒液随粪便排出导致进入机体的毒量减少,病程加长。因此,点眼滴鼻途径和低剂量是鉴定强毒株致病性细化分型时感染动物较为理想的方法。总之,病毒剂量的高低会影响临床病理特征出现的快慢和观察的难易,而不会改变原有的临床病理特征的基本特点。我国没有新城疫的标准分型强毒株,国外虽然有经过鉴定的标准分型强毒,但是如果引进会涉及农业生物安全问题。由于毒株所限,未能以典型的嗜肠道型和嗜神经型强毒株同时作为对照试验是本研究的不足之处,也是下一步进行深度研究的方面。

综上所述,F48E9株在各试验组均能够引起以显著神经症状为主的临床特征,同时伴随有呼吸道症状和下痢,虽然胃肠道也有明显的出血,但是并不影响其以神经症状为主导的临床特征,据此分析认为F48E9株为嗜神经型。同时,在对强毒株细化分型鉴定时,为了能够在较短时间内实现发病平缓,临床症状和病理变化易于观察,以及实现对接毒剂量的准确控制,建议采取点眼滴鼻途径和低剂量($10^2 \sim 10^3$ PFU)接毒方式作为鉴定的参考方法。总之,对于强毒株F48E9致病性细化分型的鉴定可以加深对其致病机理的认识,在新城疫临床诊断和防控上具有一定的指导作用。

参考文献:

- [1] 牛红兰,刘永恒,花天荣.鸡新城疫病的流行病学及综合防控措施[J].中国畜牧兽医文摘,2016(10):153-154.
- [2] Dimitrov K M, Ramey A M, Qiu X, et al. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) [J]. Infect Genet Evol, 2016, 39: 22-34.
- [3] Kang Y, Li Y, Yuan R, Li X, et al. Phylogenetic relationships and pathogenicity variation of two Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in Southern China [J]. Virol J, 2014, 11 (1): 147.
- [4] Snoeck C J, Marinelli M, Charpentier E, et al. Characterization of newcastle disease viruses in wild and domestic birds in Luxembourg from 2006 to 2008 [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79 (2): 639-645.
- [5] 李国富,朱明艳,崔尚金.新城疫流行新特点及提高防疫效果的

- 对策[J].畜牧兽医科技信息,2004(11):25-27.
- [6] Hanson R P, Brandly C A. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus [J]. Science, 1955, 122 (3160): 156-157.
- [7] Damena D, Fusaro A, Sombo M, et al. Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from outbreak cases in commercial chickens and wild pigeons in Ethiopia [J]. SpringerPlus, 2016, 5 (1): 476-484.
- [8] Meng C, Qiu X, Yu S, et al. Evolution of Newcastle disease virus quasispecies diversity and enhanced virulence after passage through chicken air sacs [J]. J Virol, 2015, 90 (4): 2052.
- [9] Allan W H, Lancaster J E, Toth B. Production and use of Newcastle disease vaccines [J]. Aust Vet J, 1976, 52 (10): 441.
- [10] Ecco R, Susta L, Afonso C L, et al. Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates [J]. Avian Pathol, 2011, 40 (2): 145-152.
- [11] Hanson R P, Spalatin J, Jacobson G S. The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus [J]. Avian Dis, 1973: 354-361.
- [12] 程旭,沈欣悦,刘梅,等.不同禽源新城疫病毒的蚀斑纯化及对不同禽种成纤维细胞的感染性[J].动物医学进展,2014,35(1):22-26.
- [13] 校海霞,姜北宇,高轩,等.鸡新城疫病毒强毒株的分离与鉴定[J].河北农业大学学报,2004,27(5):79-83.
- [14] Qiu X, Sun Q, Shuang W, et al. Entire genome sequence analysis of genotype IX Newcastle disease viruses reveals their early-genotype phylogenetic position and recent-genotype genome size [J]. Virol J, 2011, 8 (1): 117-128.
- [15] Alexander D J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses [J]. Revue Scientifique Et Technique, 2000, 19 (2): 443-62.
- [16] Susta L, Miller P J, Afonso C L, et al. Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks [J]. Vet Pathol, 2011, 48 (2): 349-360.
- [17] Lam K M. Ultrastructural changes in the cardiac muscle of chickens infected with the GB strain of Newcastle disease virus [J]. J Comp Pathol, 1996, 114 (1): 73-79.
- [18] Banerjee M, Reed W M, Fitzgerald S D, et al. Neurotropic velogenic Newcastle disease in cormorants in Michigan: pathology and virus characterization [J]. Avian Dis, 1994: 873-878.
- [19] Alexander D J, Allan W H. Newcastle disease virus pathotypes [J]. Avian Pathol, 1974, 3 (4): 269-278.
- [20] Utterback W W, Schwartz J H. Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971-1973 [J]. J Am Vet Med Assoc, 1973, 163 (9): 1080-1088.
- [21] 李杰峰,李庆锁,王玉珠,等.鸡新城疫地方强毒株的分离与毒力鉴定[J].中国家禽,2006,28(6):13-15.
- [22] Brown C, King D J, Seal B S. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence [J]. J Vet Med Educ, 1999, 36 (2): 125-132.
- [23] 程相朝,张春杰,李银聚,等.鸡新城疫嗜神经野毒株的分离鉴定及致病性实验[J].中国兽医杂志,2002,38(9):17-18.