

การวิเคราะห์ลักษณะและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่ จากไก่เนื้อในภาคกลางของประเทศไทย

Genetic Characterization and Phylogenetic Analysis of Chicken Infectious Anemia Virus from Broiler Chickens in Central Thailand

นันทพร วันดี* อาภาพร ดอกพุ่ม สุเทพ ทางดี

Nantaporn Wandee* Arphaphorn Dokphut Suthep Tangdee

Abstract

Backgrounds: Chicken infectious anemia virus (CAV) can be grouped according to the differences of genetic code which is related to the pathogenicity of the virus. Currently, the information of CAV in Thailand is still limited. The aim of this study is to analyze the genetic characteristics of the *VP1*, *VP2* and *VP3* genes and compare the phylogenetic relationship of CAV strains from central Thailand with other strains as well as vaccine strain from GenBank database.

Methods: *VP2* detection was performed by PCR from homogenized internal organs of infected broiler chickens. The specimens were collected from 2-3 week-old broiler chickens from seven farms which affected by chicken infectious anemia in Nakorn Sawan, Lopburi, and Saraburi provinces during 2008-2009. The positive samples with the most obvious target band from each farm were selected for *VP1*, *VP2* and *VP3* amplification with designed PCR primers. The amplicons were cloned into vectors and sequenced. The DNA sequences of CAV were compared with data from GenBank in nucleotide level by phylogenetic tree construction and amino acid analysis.

Results: All CAV isolates in this study showed high nucleotide identities with CAV from China 96-99% and were close to Cux-1 reference strain 96-99%. For phylogenetic analysis, the viruses were grouped in the same cluster with the Cux-1 reference strain, vaccine strains, and other Asian strains. Most of the Thai isolates were classified in the same subgroups with some CAV strains from Chinese and differed from other strains as above. For amino acid analysis, CAV isolates from central Thailand contained amino acids at the significant position close to the virulent strains. Additionally, the amino acid substitution in *VP1* of Thai CAV isolates was different from other CAV strains and vaccine strains particularly at amino acid site 97, 125 and 294.

Conclusion: The genetic characterization and phylogenetic information of CAV in this study can be used as CAV database in Thailand in order to control, prevent and monitor the chicken infectious anemia in the future.

Keywords: genetic characterization, phylogenetic analysis, chicken infectious anemia virus, broiler chickens, central Thailand

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทร 0 2579 8913 แฟกซ์ 0 2579 8918 - 9 อีเมล nantaporn.wandee@gmail.com

National Institute of Animal Health, Kasetklang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author, Tel 0 2579 8913, Fax 0 2579 8918-9, email: nantaporn.wandee@gmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่ (Chicken infectious anemia virus หรือ CAV) จัดได้หลายกลุ่มตามความแตกต่างของรหัสพันธุกรรม ซึ่งสัมพันธ์กับการก่อโรค ปัจจุบันข้อมูลของเชื้อ CAV ในประเทศไทยยังมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน VP1, VP2 และ VP3 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ที่พบในภาคกลางของประเทศไทยกับเชื้อที่พบในต่างประเทศและเชื้อจากวัคซีนในฐานข้อมูลของ GenBank

วิธีการ: ตรวจหาหีน VP2 ด้วยวิธี PCR จากอวัยวะภายในบตรวมของไก่เนื้ออายุ 2-3 สัปดาห์จากฟาร์มที่เกิดโรค 7 แห่งในจังหวัดนครสวรรค์ ลพบุรี และสระบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2552 คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมชัดเจนที่สุดฟาร์มละ 1 ตัวอย่างมาเพิ่มจำนวนยีน VP1, VP2 และ VP3 ด้วย primer ที่ออกแบบเอง จากนั้นโคลนยีนและทำ DNA sequencing เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อที่ศึกษานี้กับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ด้วย phylogenetic tree และวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

ผล: เชื้อ CAV ที่ศึกษาทั้งหมดมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับเชื้อที่พบในประเทศจีนสูง 96-99% และเหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 สูง 96-99% เมื่อจัดกลุ่มโดย phylogenetic tree พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 เชื้อจากวัคซีน เชื้อที่พบในสหรัฐอเมริกาและอีกหลายประเทศในทวีปเอเชีย ทั้งนี้เชื้อส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศจีนและอยู่ต่างกลุ่มกับเชื้อสายพันธุ์อื่นข้างต้น เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่าเชื้อ CAV ที่พบในภาคกลางของประเทศไทยมีกรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญเหมือนกับเชื้อที่ก่อโรครุนแรง และมีกรดอะมิโนในส่วน of VP1 แตกต่างจากเชื้อที่พบในประเทศอื่นและเชื้อจากวัคซีนโดยเฉพาะตำแหน่งที่ 97, 125 และ 294

สรุป: ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ในการศึกษาสามารถนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลของเชื้อไวรัสในประเทศไทยเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมป้องกัน และเฝ้าระวังโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ต่อไป

คำสำคัญ: ลักษณะทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, เชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่, ไก่เนื้อ, ภาคกลางของประเทศไทย

บทนำ

เชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่ (Chicken infectious anemia virus, CAV) เป็นสาเหตุของโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลก ทำให้ไก่อายุน้อยมีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์ (นาคี และคณะ, 2544) ไก่ป่วยจะป่วยซึม กินอาหารลดลง พบจุดเลือดออกที่ชั้นใต้ผิวหนังและกล้ามเนื้อเยื่อเมือกซีด ต่อมไทมัสฝ่อ และค่าฮีมาโตคริตต่ำ ไก่อายุมากจะมีภูมิคุ้มกันต่ำลงทำให้ติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนได้ง่าย (McNulty, 1991) โรคนี้ป้องกันได้ด้วยการให้วัคซีนเชื้อแพรระกระจายผ่านทางมูลสัตว์และถ่ายทอดเชื้อสู่ลูกไก่ผ่านทางไขฟักได้ (นาคี และคณะ, 2544; Islam *et al.*, 2016) มีรายงานพบเชื้อ CAV ครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (Yausa *et al.*, 1979) และระบาดต่อมาในหลายประเทศ เช่น จีน สหรัฐอเมริกา และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป สำหรับประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 (อุราศรี และคณะ, 2539) และพบการเกิดโรคเป็นระยะ โดยพบการระบาดที่ฟาร์มไก่เนื้อในภาคกลางในปี พ.ศ. 2551-2554 (Wanasawaeng *et al.*, 2013)

CAV จัดอยู่ในสกุล *Gyrovirus* วงศ์ *Anelloviridae* (Rosario *et al.*, 2017) มีขนาดเล็ก 19-27 nm ไม่มีเปลือกหุ้ม มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายเดี่ยวแบบ negative sense ขนาด 2.3 Kb มี open reading frame (ORF) ที่ประกอบด้วยยีน VP1, VP2 และ VP3 ซึ่งซ้อนทับกันบางส่วน เป็นยีนที่สร้าง viral protein 3 ชนิด ได้แก่ VP1, VP2 และ VP3 โดย VP1 หรือ nucleocapsid protein (52 kDa) เป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดและเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค (Yamaguchi *et al.*, 2001) ส่วน VP2 (24 kDa) เป็น non-structural protein ซึ่งมี dual-specificity protein phosphatases (DSPs) ที่เกี่ยวข้องกับการชะงักภูมิคุ้มกันและขั้นตอนประกอบเปลือกหุ้มของไวรัส (Peters *et al.*, 2006) โดย VP1 และ VP2 เป็นตำแหน่งจำเพาะสำหรับ neutralizing

antibodies (Noteborn *et al.*, 1998) และส่วน VP3 หรือ apoptin (16 kDa) เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เนื่องจกแบบ apoptosis (Noteborn *et al.*, 1994) เชื้อ CAV ทั่วโลกจัดอยู่ในซีโรไทป์เดียวกัน ยกเว้นเชื้อ CAV-7 ของสหรัฐอเมริกาซึ่งจัดอยู่ในซีโรไทป์ 2 (Spackman *et al.*, 2002a, 2002b) และสามารถจัดกลุ่มตามความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมซึ่งสัมพันธ์กับการก่อโรคของเชื้อไวรัส (Li *et al.*, 2017; Abdel-Mawgod *et al.*, 2018) จากการศึกษาเชื้อ CAV ในประเทศไทยของ Wanasawaeng *et al.* (2013) ซึ่งศึกษาโปรตีน VP1 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อที่พบในประเทศจีนและญี่ปุ่น รวมทั้งเหมือนกับเชื้อจากวัคซีนที่ใช้ในประเทศไทย ทั้งนี้ ข้อมูล CAV ของประเทศไทยยังจำกัดอยู่เฉพาะบางส่วนของโปรตีน VP1 เท่านั้น ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาโปรตีน VP1, VP2 และ VP3 เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลโปรตีนทั้ง 3 ชนิดของเชื้อ CAV ในประเทศไทย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ที่ระบาดในภาคกลางของประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในต่างประเทศและเชื้อจากวัคซีนในฐานะข้อมูลของ GenBank เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ ต่อมไทมัส ตับ ม้าม และไขกระดูกของไก่เนื้ออายุ 2-3 สัปดาห์ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR และเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -80°C ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เป็นตัวอย่างจากฟาร์ม 7 แห่ง ที่มีการระบาดและไม่ได้ให้วัคซีนป้องกันโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ ในจังหวัดนครสวรรค์ ลพบุรี และสระบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2552 จำนวน 15 ตัวอย่าง

การตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR

เตรียม 10% suspension ของอวัยวะในบดรวมในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2-7.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำของเหลวใสส่วนบนที่ปั่นแยกได้ มาสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรม

DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ตรวจสอบสารพันธุกรรมซ้ำอีกครั้งด้วยการหาฮีน VP2 โดยใช้ primer (F) 5'-CTAAGATCTGCAACTGCGGA-3' และ primer (R) 5'-CCTTGGGAAGCGGATAGTCAT-3' ตามวิธีของ National Veterinary Services Laboratory สหรัฐอเมริกา (Rath *et al.*, 2003) เตรียมส่วนผสมสำหรับ PCR โดยใช้ 2X GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) 12 µl, primer 20 pmol/µl ชนิดละ 1 µl แล้วเติม DNA ที่สกัดได้ 3 µl ในปฏิกิริยารวม 25 µl นำไป run ด้วยเครื่อง T100™ thermal cycler (Biorad, USA) โดยตั้งค่า PCR cycle ดังนี้ 95°C, 2 นาที และ 35 รอบของโปรแกรม (denaturation ที่ 95°C, 45 วินาที; annealing ที่ 55°C, 45 วินาที; extension ที่ 72°C, 1 นาที) ตามด้วย 72°C, 10 นาที ตรวจสอบ PCR product โดยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide และอ่านผลด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (SynGene, UK) ซึ่งผลบวกจะแสดงแถบ DNA ขนาด 420 bp โดยมีตัวอย่างควบคุมบวกเป็นเชื้อ CAV ที่ยืนยันผลการทดสอบด้วยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) และตัวอย่างควบคุมลบเป็น nuclease-free water

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของฮีน VP1, VP2 และ VP3

คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมจากการตรวจฮีน VP2 ที่ชัดเจนที่สุดฟาร์มละ 1 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยการเพิ่มปริมาณฮีน VP1, VP2 และ VP3 จากสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่คัดเลือก โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากเชื้ออ้างอิง Cux-1 ในฐานะข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยโปรแกรม Genetix software (<http://genetix.software.informer.com/10.1/>) และตรวจสอบด้วยโปรแกรม AnnHyb version 4.938 (<http://bioinformatics.org/annhyb/>) โดยมี primer sequence ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้น เตรียมส่วนผสมสำหรับทำ PCR โดยใช้ชุดน้ำยา 2X GoTaq Green master mix (Promega, USA) 12 µl, primer CAV-F และ CAV-R 20 pmol/µl ชนิดละ 1 µl โดยทดสอบครั้งละ 1 คู่ แล้วเติม DNA ที่สกัดได้ 3 µl ในปฏิกิริยารวม 25 µl นำไป run ด้วยเครื่อง T100™ thermal cycler (Biorad, USA) โดยตั้งค่าการทำ

ตารางที่ 1 Primer สำหรับการทำ DNA sequencing ของยีน VP1, VP2 และ VP3 ในการศึกษา

Primer	Primer sequence	Annealing temperature	Position	Amplicon size (bp)
CAV1-F	5'-GAATTCGAGTGGTTACTATTCC-3'	55°C	1-857	857
CAV1-R	5'-GCCATCTTACAGTCTTATACGC-3'			
CAV2-F	5'-ACCGATCAACCCAAGCCTC-3'	57°C	717-1658	942
CAV2-R	5'-CTCATTTTCCCGTCGCATAA-3'			
CAV3-F	5'-TTGCCACTAAGAATGAGGGATC-3'	56°C	1490-2319	830
CAV3-R	5'-GATAGTGCATAAATCTATTTCTGCGT-3'			

PCR ดังนี้ 95°C, 2 นาที และ 35 รอบของโปรแกรม (denaturation ที่ 94°C, 1 นาที; annealing ที่ 55-57°C, 1 นาที ตามชนิดของ primer; extension ที่ 72°C, 1 นาที) ตามด้วย 72°C, 10 นาที และ hold ไว้ที่ 4°C ตรวจสอบ PCR product โดยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide และอ่านผลด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (SynGene, UK)

การโคลนยีนและ DNA sequencing

สกัดสารพันธุกรรมจาก PCR product ที่ได้จาก primer แต่ละคู่บน agarose gel ด้วย QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) และทำให้บริสุทธิ์ด้วย PureLink™ Quick Purification kit (Invitrogen, USA) เชื่อมต่อ product ข้างต้นกับพลาสมิดพาหะ pGEM™ T-Easy Vector system (Promega, USA) แล้วนำพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* competent cells สายพันธุ์ DH5α (ThermoFisher Scientific, USA) โดยใช้ Gene Pulser X cell™ Electroporation System (Biorad, USA) จากนั้น คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) agar ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และ IPTG (blue/white screening) นำมาสกัดพลาสมิด DNA สายผสมด้วย NucleoSpin™ Plasmid (Macherey-Nagel GmbH, Germany) แล้วตรวจสอบด้วยวิธี PCR จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่ได้มาหาลำดับสารพันธุกรรม โดยใช้ DNA 10-30 ng และ Bigdye™ terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem, USA) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม ABI 3130 DNA genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

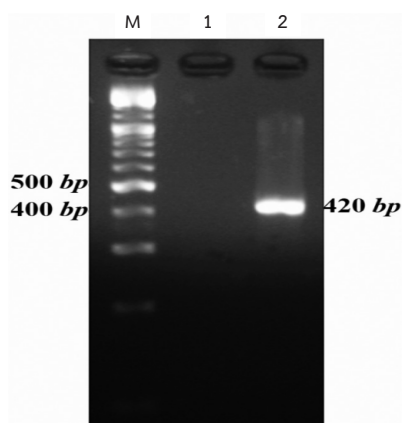
การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ด้วยแผนภูมิ phylogenetic tree

วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วนำลำดับสารพันธุกรรมมาจัดเรียงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม BioEdit sequence alignment editor 7.2.5 (BioEdit) (Hall, 1999) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ในระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อ CAV ที่ศึกษากับเชื้ออ้างอิง Cux-1 (NC_001427) และเชื้อ CAV จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) วิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura 2-parameter ร่วมกับการกระจายตัวแกมมา (+G, parameter = 0.05) ตรวจสอบความถูกต้องของแผนภูมิโดยใช้ bootstrap test (1,000 replicates) และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid) ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA X version 10.0.5 (Kumar *et al.*, 2018)

ผลและวิจารณ์

การตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ CAV

การตรวจหาเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR ในปัจจุบัน นิยมใช้การตรวจหาเชื้อ VP2 เนื่องจากสามารถตรวจพบได้หลังจากการติดเชื้อในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง (Peters *et al.*, 2005, 2006) ในขณะที่ยีน VP1 จะตรวจพบภายหลังการติดเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Douglas *et al.*, 1995) ในการทดสอบครั้งนี้ตรวจพบผลผลิตของยีน VP2 ขนาด 420 bp จากอวัยวะภายในบตรวมทั้ง 15 ตัวอย่าง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ผลการตรวจหา ยีน VP2 ของเชื้อ CAV จากตัวอย่างอวัยวะภายใน
บตรวมของไก่เนื้อ ด้วยวิธี PCR โดยแถว M แสดง 100 bp molecular
weight marker (Promega, USA), แถว 1 แสดงผลลบต่อ ยีน VP2 และ
แถว 2 แสดงผลบวกต่อ ยีน VP2 ขนาด 420 bp

การวิเคราะห์ยีน VP1, VP2 และ VP3

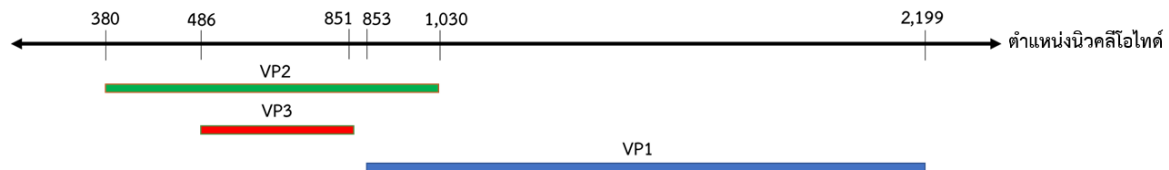
คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมชัดเจน
ที่สุดของแต่ละฟาร์ม รวม 7 ตัวอย่าง ไปโคลนเพื่อเพิ่มจำนวน
ยีน VP1, VP2 และ VP3 แล้วตรวจวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม
ด้วยวิธี DNA sequencing จากการศึกษาค้นพบว่า เชื้อ CAV
ที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ยีนยาวประมาณ
1,820 นิวคลีโอไทด์ (nt) ในตำแหน่งที่ 380–2199 และมีส่วน
ORFs เริ่มจากยีน VP2 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ 380–1,030 (651
nt) ถัดมาเป็นยีน VP3 ซึ่งซ้อนอยู่กับยีน VP2 ในตำแหน่งที่
486–851 (366 nt) และส่วนท้ายเป็นยีน VP1 ในตำแหน่งที่
853–2,199 (1,349 nt) (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1
ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI, 2000) แม้ว่ายีนทั้ง 3 ชนิด
จะมีการซ้อนทับในตำแหน่งเดียวกันบางส่วน แต่โดยทั่วไป
การแสดงออกของยีนและการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนมัก
จะทำการวิเคราะห์แยกตามชนิดของยีนเพื่อศึกษาหน้าที่
ของโปรตีนซึ่งแตกต่างกัน

เมื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST
พบว่ายีน VP1 เป็นยีนที่มีความหลากหลายมากที่สุดเมื่อ
เปรียบเทียบกับเชื้อ CAV ในฐานข้อมูล GenBank เมื่อนำเชื้อ
ที่ศึกษาทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับค่าความคล้ายคลึงของลำดับ
นิวคลีโอไทด์ (nucleotide identities) กับเชื้ออ้างอิง Cux-1
พบว่า แม้เชื้อที่ศึกษาและเชื้ออ้างอิงจะมีความแตกต่างของ
นิวคลีโอไทด์มากกว่า 50 ตำแหน่ง (ไม่แสดงผลการทดสอบ)
แต่โดยรวมแล้วพบว่ามี ความคล้ายคลึงกันประมาณ
96–99% (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี

การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยมาก เมื่อ
พิจารณาส่วนที่ซ้อนทับกับยีน VP2 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์
แตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก T เป็น G
ในตำแหน่งที่ 892 (T892G) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการ
เปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 14 จาก serine เป็น
alanine (S14A) ส่วนบริเวณอื่นของยีน VP1 พบการ
เปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลให้เกิดการแทนที่ของ
กรดอะมิโนรวม 12 ตำแหน่ง (ไม่แสดงผลการทดสอบ)
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะพันธุกรรมของเชื้อที่
พบในประเทศจีนพบมีความคล้ายคลึงกันถึง 96–99%
(ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wanasawaeng
et al. (2013)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ VP1, VP2 และ VP3

VP1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 449 ตัว โดยเชื้อ
CAV ที่ศึกษามีการแทนที่ของกรดอะมิโน (amino acid
substitution) แตกต่างจากเชื้ออ้างอิง Cux-1 ในตำแหน่งที่
14, 97, 125, 144, 157, 213, 251, 254, 269, 287, 290,
294, 370 และ 436 รวม 14 ตำแหน่ง โดยไม่พบการแทนที่
ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 75, 89, 125, 141 และ 144
จากตารางที่ 3 พบกรดอะมิโนชนิด threonine ในตำแหน่ง
ที่ 89 (T89) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ซึ่งเป็นลักษณะ
ของเชื้อ CAV ที่ก่อโรครุนแรง โดยเชื้อ CAV ที่มี arginine
แทนที่ threonine ในตำแหน่งที่ 89 (T89R) เป็นเชื้อที่มี
ความรุนแรงในการก่อโรคลดลง (Todd *et al.*, 2002)
นอกจากนี้ กรดอะมิโนลำดับที่ 139–151 ในบริเวณที่มี
ความผันแปรสูง (hypervariable region) แสดงถึงความ
สามารถในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ (Renshaw
et al., 1996) ซึ่งเชื้อ CAV ที่ศึกษามี lysine ในตำแหน่งที่
139 (K139) เหมือนกับเชื้ออ้างอิง ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวน
ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดี แต่มี glutamic acid แทน aspartic
acid ในตำแหน่งที่ 144 (D144E) เช่นเดียวกับเชื้อ CAV อื่น
ใน cluster I และ II ส่วนเชื้อที่พบ glutamine ในตำแหน่งที่
139 (K139Q) และ 144 (D144Q) เช่น เชื้อใน cluster III
จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายต่ำ
อีกทั้งพบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี glutamine ในตำแหน่งที่
394 (Q394) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิงและเชื้อก่อโรคจาก
รายงานอื่น (Yao *et al.*, 2019) โดยเชื้อที่พบ histidine
แทนที่ glutamine (Q394H) มักเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของยีน VP1, VP2 และ VP3 ของเชื้อ CAV

ตารางที่ 2 ข้อมูลและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CAV ที่ศึกษากับเชื้ออ้างอิง Cux-1 โดยใช้โปรแกรม BLAST

รหัสตัวอย่าง	ที่มา		ปีที่พบ (พ.ศ.)	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
	จังหวัด	อำเภอ		
NIAH104075/51	นครสวรรค์	ท่าตะโก	2551	96.29
NIAH104076/51	นครสวรรค์	เมือง	2551	96.04
NIAH106509/51	นครสวรรค์	หนองบัว	2551	96.88
NIAH115760/51	นครสวรรค์	ตากฟ้า	2551	99.38
NIAH106146/51	สระบุรี	พระพุทธบาท	2551	96.62
NIAH104822/51	ลพบุรี	พัฒนานิคม	2551	98.30
NIAH104368/52	ลพบุรี	ชัยบาดาล	2552	97.47

ตารางที่ 3 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CAV ที่ศึกษากับเชื้อที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)																
	NIAH104075/51	NIAH104076/51	NIAH106509/51	NIAH115760/51	NIAH106146/51	NIAH104822/51	NIAH104368/52	* KC762958 TH-PS4-09	* KC762965 TH-BR4-11	** KY486144 HLJ15170/China	** KY486155 LN15170/China	** KY486137 HLJ15108/China	*** AJ890284 Nobilis P4 vac	*** AF313470 Del-Ros vac	**** AF227982 CAU2697/Australia	**** AF285882 SMSC-1/Malaysia
NIAH104075/51		99.66	99.09	98.36	99.70	99.57	99.66	99.31	98.33	98.23	98.23	96.42	97.04	96.59	94.13	95.13
NIAH104076/51			98.97	98.23	99.44	99.31	99.40	99.41	98.43	98.06	98.06	96.34	96.96	96.55	94.04	94.96
NIAH106509/51				99.27	98.88	98.75	98.84	99.41	98.43	97.67	97.67	96.90	98.52	96.81	94.23	95.43
NIAH115760/51					98.15	98.19	98.10	98.04	99.21	97.11	97.11	97.33	99.63	97.20	94.53	95.90
NIAH106146/51						99.78	99.87	99.90	98.72	98.45	98.45	96.64	97.11	96.81	94.35	95.34
NIAH104822/51							99.83	99.90	98.72	98.49	98.49	96.68	97.11	96.85	94.31	95.39
NIAH104368/52								99.99	98.82	98.49	98.49	96.68	97.11	96.85	94.40	95.39

หมายเหตุ * เชื้อก่อโรคที่พบในประเทศไทยจากการศึกษาจากหน้า, ** เชื้อก่อโรคที่พบในประเทศจีน, ***เชื้อจากวัคซีน, ****เชื้อที่พบในประเทศอื่น

(Yamaguchi *et al.*, 2001) นอกจากนี้ พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาใน subgroup Ib มี leucine ในตำแหน่งที่ 97 (L97) และ 125 (L125) และพบ histidine ในตำแหน่งที่ 294 (H294) ยกเว้นเชื้อ CAV จากอำเภอตากฟ้า จังหวัด นครสวรรค์ (NIAH115760/51) ที่มี methionine ในตำแหน่งที่ 97 (M97) Isoleucine (I) ในตำแหน่งที่ 125 (I125) และ glutamine (Q) ในตำแหน่งที่ 294 (Q294) เหมือนกับเชื้ออ้างอิงและเชื้อจากวัคซีน

ผลการศึกษา VP2 พบว่า เชื้อ CAV ในการศึกษา นี้ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อ CAV สายพันธุ์อื่นมากถึง 98-100% (ไม่แสดงผลการทดสอบ) ทั้งนี้ VP2 เป็นโปรตีน ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมาก โดยเฉพาะ บริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ 94-103 (Peters *et al.*, 2002) โดยพบว่าเชื้อ CAV ที่ ศึกษา มี cysteine ในตำแหน่งที่ 95 (C95) และ 97 (C97) และมี lysine ในตำแหน่งที่ 102 (K102) ซึ่งแสดงถึงความ

หมายเหตุ . หมายถึง มีกรดอะมิโนเหมือนชื่ออ้างอิง Cux-1, - หมายถึง ไม่ทราบข้อมูล

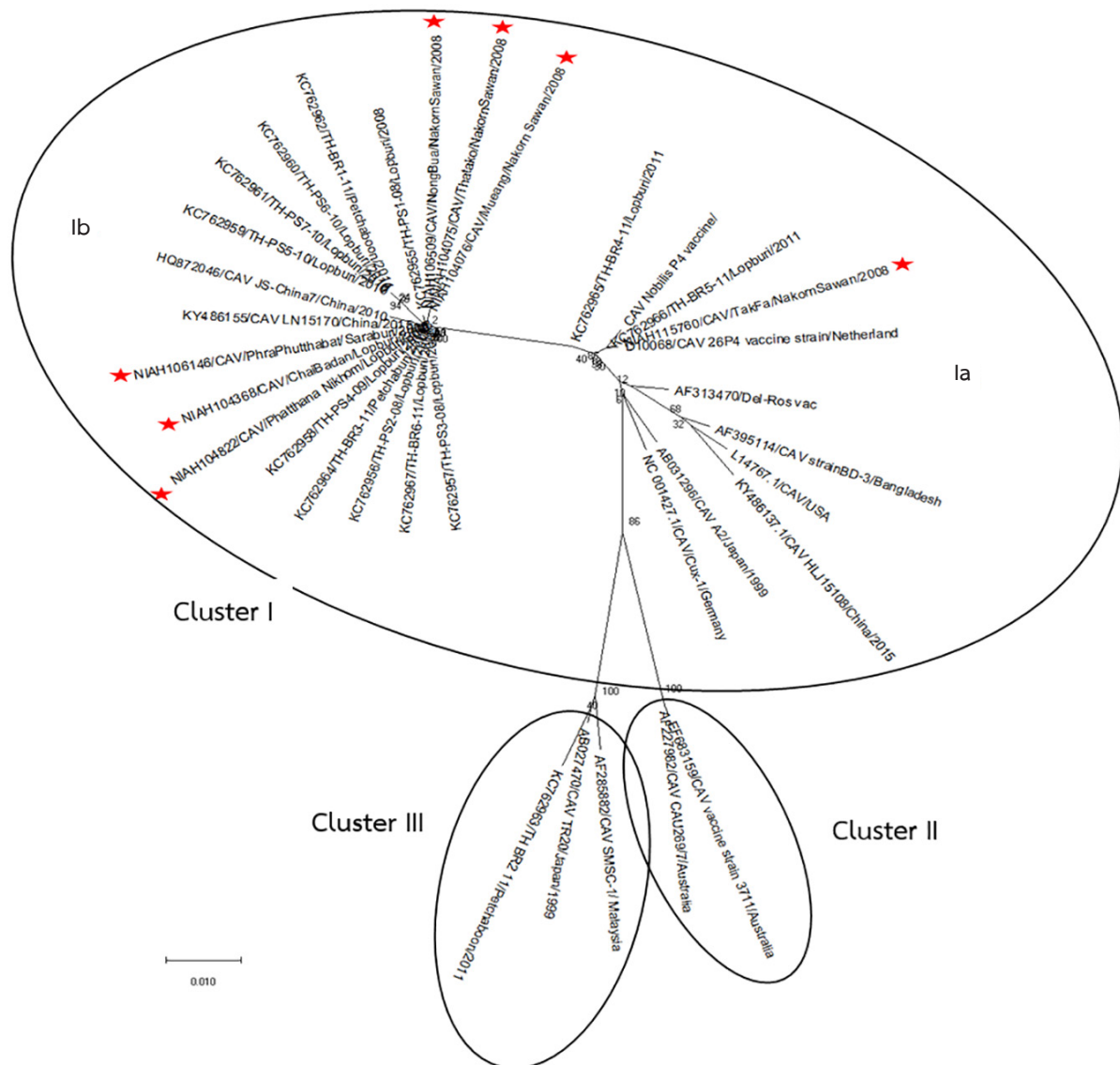
สายพันธุ์		กรดอะมิโนของ VP1										กรดอะมิโนของ VP2										กรดอะมิโนของ VP3															
Code		14	75	89	97	125	139	141	144	157	213	251	254	269	287	290	294	370	394	436	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	153	103	108	116	118		
Cluster I: subgroup Ia		S	V	T	M	I	K	Q	D	V	L	Q	G	R	A	A	Q	S	Q	V	I	C	N	C	G	Q	F	R	K	H	A	S	T	K	R		
NC_001427	Cux-1/ Germany	A	.	.	.	.	.	.	E	M	F	R	E	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
NIAH115760/51	TakFa/NakornSawan/2008	A	.	.	.	.	.	.	E	M	F	R	E	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.		
AF313470	Del-Ros vaccine	A	.	.	.	.	.	.	E	.	.	R	E	.	S	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C		
AJ890284	Nobilis P4 vaccine	A	.	.	.	.	.	E	M	M	.	R	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
KC762965	TH-BR4-11/Lopburi/2011	A	.	.	L	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	N	.	R	.	
Cluster I: subgroup Ib																																					
NIAH104075/51	Thatako/NakornSawan/2008	A	.	.	L	L	.	E	M	M	F	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
NIAH104076/51	Mueang/NakornSawan/2008	A	.	.	L	L	.	E	M	M	F	R	E	T	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.		
NIAH106509/51	NongBua/Nakorn Sawan/2008	A	.	.	L	L	.	E	M	M	F	R	E	.	T	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.		
NIAH106146/51	PhraPhutthabat/Saraburi/2008	A	.	.	L	L	.	E	M	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
NIAH104822/51	PhatthanaNikhom/Lopburi/2008	A	.	.	L	L	.	E	M	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
NIAH104368/52	ChaiBadan/Lopburi/2009	A	.	.	L	L	.	E	M	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
HQ872046	JS-China7/China/2010	A	.	.	L	L	.	E	M	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
KC762955	TH-PS1-08/ Lopburi/2008	A	L	.	L	L	.	.	M	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
KC762958	TH-PS4-09/ Lopburi/2009	A	.	.	L	L	.	.	M	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
KC762961	TH-PS7-10/ Lopburi/2010	A	.	.	L	L	.	.	M	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
KC762964	TH-BR3-11/ Petchaboon/2011	A	.	.	L	L	.	.	M	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	N	.	R	C
Cluster II																																					
EF683159	Vac strain 3711/ Australia	A	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	E	.	S	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C		
AF227982	CAU/7/Australia	A	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	E	.	T	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C		
Cluster III																																					
AF285882	SMSC-1/Malaysia	A	I	.	L	.	Q	.	Q	.	.	R	E	.	T	P	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C		
KC762963	TH-BR2-11/ Petchaboon/2011	A	I	.	L	.	Q	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C	
AB027470	TR20/Japan/1999	A	I	.	L	.	Q	.	Q	.	.	R	E	.	T	P	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C		

สามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคของเชื้อไวรัส โดยเชื้อที่มี serine แทน cysteine ในตำแหน่งที่ 95 (C95S) และ 97 (C97S) ร่วมกับมี aspartic acid แทน lysine ที่ตำแหน่ง 102 (K102D) จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคลดลง (Peters *et al.*, 2005) นอกจากนี้พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามีกรดอะมิโนของ VP2 ทั้ง 216 ตัวเหมือนกับเชื้ออ้างอิงทุกตำแหน่ง ยกเว้นเชื้อจากอำเภอย้ายบาดาล จังหวัดลพบุรี (NIAH104368/52) ที่พบการแทนที่ของกรดอะมิโนนอก catalytic site 1 แห่ง โดยพบกรดอะมิโนชนิด valine แทน alanine ที่ตำแหน่ง 153 (A153V) เช่นเดียวกับเชื้อ CAV ที่พบในจังหวัดลพบุรีและจังหวัดเพชรบูรณ์จากรายงานก่อนหน้านี้ (Wanasawaeng *et al.*, 2013) เชื้อจากวัคซีน Del-Ros และเชื้อ CAV อื่นที่อยู่ใน cluster II และ III โดยยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวกับการแสดงออกของเชื้อไวรัส

VP3 เป็นโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมากเช่นเดียวกับ VP2 โดย VP3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 121 ตัวและมี proline เป็นส่วนประกอบจำนวนมาก (proline rich protein) จากตารางที่ 3 พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี threonine ในตำแหน่งที่ 108 (T108) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง ซึ่งปฏิกิริยา phosphorylation ของ T108 มีความสัมพันธ์กับการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ซึ่งจะเกิดกับเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งเท่านั้น (tumor-specific activity) (Rohn *et al.*, 2002) ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาในการนำ VP3 ไปใช้รักษาโรคมะเร็งในคน (Maddika *et al.*, 2006) และพบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาทั้งหมดมี arginine แทนที่ lysine ที่ตำแหน่ง 116 (K116R) และบางสายพันธุ์มี asparagine แทนที่ serine ที่ตำแหน่ง 103 (S103N) และ arginine แทนที่ cysteine ที่ตำแหน่ง 118 (C118R) ทั้งนี้ ยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวกับการแสดงออกของเชื้อไวรัส

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ CAV พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1, VP2 และ VP3 ได้เป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 3) โดยเชื้อที่ศึกษามีรหัสพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อจากประเทศในทวีปเอเชียและเชื้อสายพันธุ์วัคซีนที่ใช้ในท้องตลาดเช่นเดียวกับการศึกษาของ Wanasawaeng *et al.* (2013) ซึ่งเชื้อ CAV ในการศึกษาจัดอยู่ใน cluster I และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม คือ subgroup Ia และ Ib โดย subgroup Ia ประกอบด้วยเชื้อ CAV ที่ศึกษาจากฟาร์มในอำเภอดงหลวง จังหวัดนครสวรรค์ (NIAH115760/51) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 เชื้อสายพันธุ์วัคซีน Del-Ros (AF313470) และวัคซีน Nobilis P4 (AJ890284) หรือ 26P4 (D10068) รวมทั้งเชื้อ CAV ที่พบในประเทศจีน (KY486137) บังกลาเทศ (AF395114) ญี่ปุ่น (AB031296) สหรัฐอเมริกา (L14767) และเชื้อที่พบในประเทศไทย (KC762965) โดย Wanasawaeng *et al.* (2013) ส่วน subgroup Ib ประกอบด้วยเชื้อ CAV ที่ศึกษาจากฟาร์มที่เหลืออีก 6 แห่ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยที่ศึกษาโดย Wanasawaeng *et al.* (2013) และเชื้อที่พบในประเทศจีน (HQ872046 และ KY486155) นอกจากนี้ พบว่าเชื้อ CAV จากออสเตรเลีย (EF683159 และ AF227982) มีความแตกต่างจากกลุ่มเชื้อข้างต้นจึงจัดอยู่ใน cluster II ในขณะที่เชื้อ CAV จากประเทศมาเลเซีย (AF285882) ญี่ปุ่น (AB027470) และเชื้อที่พบในประเทศไทยสายพันธุ์ TH-BR2-11 (KC762963) จากการศึกษานี้ของ Wanasawaeng *et al.* (2013) จัดอยู่ใน cluster III ทั้งนี้ เชื้อ CAV สามารถจัดกลุ่มได้หลายแบบขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบการวิเคราะห์ผลของผู้วิจัย (Wanasawaeng *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2019) แม้ว่าเชื้อ CAV แต่ละสายพันธุ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างกัน แต่ก็ยังถือว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยมาก และเชื้อจากวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันยังมีความใกล้เคียงกับเชื้อ CAV ที่พบในประเทศไทย

การวิเคราะห์ phylogenetic tree



รูปที่ 3 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ในระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1, VP2 และ VP3 ของเชื้อ CAV ในการศึกษา (★) เปรียบเทียบกับเชื้อ CAV จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจัดได้เป็น 3 กลุ่ม (cluster I, II และ III) โดย cluster I สามารถจัดกลุ่มย่อยได้เป็น subgroup Ia และ Ib

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบว่าการจัดกลุ่มเชื้อ CAV ที่ก่อให้เกิดโรคในประเทศไทยสามารถทำได้โดยการตรวจลักษณะที่แตกต่างทางพันธุกรรมของยีน VP1 เปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในต่างประเทศ เชื้อที่ใช้การผลิตวัคซีนและเชื้ออ้างอิงโดยการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนและโอกาสในการเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การระบาดของโรค การเฝ้าระวังการแพร่ของเชื้อสายพันธุ์จากต่างประเทศ ตลอดจนนำไปสู่การปรับปรุงการผลิตวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันโรคให้สอดคล้องกับเชื้อที่ก่อโรคในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยาและกลุ่มระบาดวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและสนับสนุนข้อมูลประกอบการวิเคราะห์ ขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดที่เกี่ยวข้องสำหรับการประสานงานและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ ขอขอบคุณเกษตรกรฟาร์มและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

- นำดี แซเฮง นรินทร์ อุปกรินทร์ ภัทรา มุลจิตร และวรวิทย์ วิชวัลคุ. 2544 (2001). การติดเชื้อโลหิตจางในไก่แบบถาวร. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. หน้า 494-498.
- อุราศรี ดันตสวัสดิ์ พรทิพย์ ศิริวรรณ และ อรุณี ชัยสิงห์. 2539 (1996). การศึกษาเชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่ทางไวรัสวิทยาและซีรัมวิทยา. สัตวแพทยสาร. 47(3-4): 45-56.
- Abdel-Mawgod, S., Adel, A., Arafa, A.S. and Hussein, H.A. 2018. Full genome sequences of chicken anemia virus demonstrate mutations associated with pathogenicity in two different field isolates in Egypt. *Virus Disease*. 29(3). 333-341.
- Douglas, A.J., Phenix, K., Mawhinney, K.A., Todd, D., Mackie, D.P. and Curran, W.L. 1995. Identification of a 24 kDa protein expressed by chicken anaemia virus. *J Gen Virol*. 76(7): 1557-1562.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. 41(41): 95-98.
- Islam, A.F., Alsharari, M., Renz, K.G., Burgess, S.K. and Walkden-Brown, S.W. 2016. Lateral transmission of chicken anaemia virus: Is it faecal-oral or dust inhalation? Proceeding of the 9th International poultry conference, Hurghada, Egypt. 162-173.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 35(6): 1547-1549.
- Li, Y., Fang, L., Cui, S., Fu, J., Li, X., Zhang, H., Cui, Z., Chang, S., Shi, W. and Zhao, P. 2017. Genomic characterization of recent chicken anemia virus isolates in china. *Front Microbiol*. (8): 401.
- Maddika, S., Mendoza, F.J., Hauff, K., Zamzow, C.R., Paranjothy, T. and Los, M., 2006. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther*. 5(1): 10-19.
- McNulty, M.S., 1991. Chicken anaemia agent: a review. *Avian pathol*. 20(2): 187-203.
- Noteborn, M.H., Todd, D., Verschuere, C.A., De Gauw, H.W., Curran, W.L., Veldkamp, S., Douglas, A.J., McNulty, M.S. and Koch, G., 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*. 68(1): 346-351.
- Noteborn, M.H., Verschuere, C.A., Koch, G. and Van der Eb, A.J. 1998. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *J Gen Virol*. 79(12): 3073-3077.
- Peters, M.A., Jackson, D.C., Crabb, B.S. and Browning, G.F. 2002. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem*. 277(42): 39566-39573.
- Peters, M.A., Jackson, D.C., Crabb, B.S. and Browning, G.F. 2005. Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosine protein phosphatase activities. *J Gen Virol*. 86(3): 623-630.
- Peters, M.A., Crabb, B.S., Washington, E.A. and Browning, G.F. 2006. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *J Gen Virol*. 87(4): 823-831.
- Rath, N.C., Parcells, M.S., Xie, H. and Santin, E. 2003. Characterization of a spontaneously transformed chicken mononuclear cell line. *Vet immunol immunop*. 96(1-2): 93-104.
- Renshaw, R.W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P.H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio, B., Harrington, S. and Schat, K.A. 1996. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J Virol*. 70(12): 8872-8878.
- Rohn, J.L., Zhang, Y.H., Aalbers, R.I., Otto, N., den Hertog, J., Henriquez, N.V., van de Velde, C.J., Kuppen, P.J., Mumberg, D., Donner, P. and Noteborn, M.H. 2002. A tumor-specific kinase activity regulates the viral death protein Apoptin. *J Biol Chem*. 277(52): 50820-50827.
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P. and Varsani, A. 2017. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol*. 162(5): 1447-1463.
- Spackman, E., Cloud, S.S., Pope, C.R. and Rosenberger, J.K., 2002a. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate I. Pathogenesis. *Avian Dis*. 46(4): 945-955.
- Spackman, E., Cloud, S.S. and Rosenberger, J.K., 2002b. Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate II. Antigenic and physicochemical characteristics. *Avian Dis*. 46(4): 956-963.
- Todd, D., Scott, A. N., Ball, N. W., Borghmans, B. J., & Adair, B. M. 2002. Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. *J Virol*. 76(16): 8472-8474.
- Wanasawaeng, W., Buatong, J., Chaichote, S. and

- Chansiripornchai, N. 2013. Molecular Characterization of chicken infectious anemia virus outbreaks during 2008-2011 in Thailand. *Thai J Vet Med.* 43(4): 497.
- Yamaguchi, S., Imada, T., Kaji, N., Mase, M., Tsukamoto, K., Tanimura, N. and Yuasa, N. 2001. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J Gen Virol.* 82(5): 1233-1238.
- Yao, S., Tuo, T., Gao, X., Han, C., Yan, N., Liu, A., Gao, H., Gao, Y., Cui, H., Liu, C. and Zhang, Y. 2019. Molecular epidemiology of chicken anaemia virus in sick chickens in China from 2014 to 2015. *PloS one.* 14(1): p.e0210696.
- Yausa, N., Taniguchi, T. and Yoshida, I. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.* 23(2): 366-385.