

การวิเคราะห์ลักษณะและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่
จากไก่เนื้อในภาคกลางของประเทศไทย

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

นันทพร วันดี* อภาพร ดอกพุ่ม สุเทพ ทางดี
Nantaporn Wandee* Arphaphorn Dokphut Suthep Tangdee

Abstract

Backgrounds: Chicken infectious anemia virus (CAV) can be grouped depending on 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 was 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 Chinese isolates 96-100% and high similarity to Cux-1 reference strain 94-99%. 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 Chinese strains and differed from other strains as above. For amino acid analysis, CAV isolates from central Thailand contained amino acids at the significant position similar 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 เขตกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม. 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 ที่พบในภาคกลางของประเทศไทยกับเชื้อที่พบในต่างประเทศและเชื้อสายพันธุ์วัคซีนจากฐานข้อมูลของ GenBank

วิธีการ : ตรวจหาเอ็น VP2 ด้วยวิธี PCR จากอวัยวะภายในบตรวมของไก่เนื้ออายุ 2-3 สัปดาห์ จากฟาร์มที่เกิดโรค 7 แห่ง ในจังหวัดนครสวรรค์ ลพบุรี และสระบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2552 คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมชัดเจนที่สุดฟาร์มละ 1 ตัวอย่าง มาเพิ่มจำนวนยีน VP1, VP2 และ VP3 ด้วย primer ที่ออกแบบเอง จากนั้น โคลนเอ็นและทำ DNA sequencing เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อที่ศึกษานี้กับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ด้วย phylogenetic tree และวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมในระดับกรดอะมิโน

ผล : เชื้อ CAV ที่ศึกษาทั้งหมดมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อที่พบในประเทศจีนสูง 96-100% และเหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 สูง 94-99% เมื่อจัดกลุ่มโดย phylogenetic tree พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 เชื้อสายพันธุ์วัคซีน เชื้อที่พบในสหรัฐอเมริกาและอีกหลายประเทศในทวีปเอเชีย ทั้งนี้เชื้อส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศจีนบางสายพันธุ์และอยู่ต่างกลุ่มกับเชื้อสายพันธุ์อื่นข้างต้น เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าเชื้อ CAV ที่พบในภาคกลางของประเทศไทยมีกรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญเหมือนกับเชื้อ CAV ที่ก่อโรครุนแรง และมีกรดอะมิโนในส่วน of VP1 แตกต่างจากเชื้อที่พบในประเทศอื่นและเชื้อสายพันธุ์วัคซีนโดยเฉพาะตำแหน่งที่ 97, 125 และ 294

สรุป : ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ในการศึกษาสามารถนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลของเชื้อไวรัสในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมป้องกัน และเฝ้าระวังโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ต่อไป

คำสำคัญ: ลักษณะทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, เชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่, ไก่เนื้อ, ภาคกลางของประเทศไทย

บทนำ

เชื้อไวรัสโลหิตจางติดต่อในไก่ (Chicken infectious anemia virus, CAV) เป็นสาเหตุของโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลก ทำให้ไก่อายุน้อยมีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะช่วงอายุ 2-4 สัปดาห์ (นำดี และคณะ, 2544) ไก่ป่วยจะซึม กินอาหารลดลง พบจุดเลือดออกที่ชั้นใต้ผิวหนัง และกล้ามเนื้อเยื่อเมือกซีด ต่อมามีผลต่ออวัยวะอื่น ๆ และค่าฮีมาโตคริตต่ำ ไก่อายุมากจะมีภูมิคุ้มกันต่ำลงทำให้ติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนได้ง่าย (McNulty, 1991) โรคนี้ป้องกันได้ด้วยการให้เชื้อสายพันธุ์วัคซีน เชื้อแพร่กระจายผ่านทางมูลสัตว์และถ่ายทอดเชื้อสู่ลูกไก่ผ่านทางไข่ฟักได้ (นำดี 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) ที่เกี่ยวข้องกับภาวะกดภูมิคุ้มกันและขั้นตอนประกอบเปลือกหุ้มของไวรัส (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-Mawad *et al.*, 2018) จากการศึกษาเชื้อ CAV ในประเทศไทยของ Wanasawaeng *et al.* (2013) ซึ่งศึกษาโปรตีน VP1 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อที่พบในประเทศจีนและญี่ปุ่น รวมทั้งเหมือนกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีนที่ใช้ในประเทศไทย ทั้งนี้ข้อมูล CAV ของประเทศไทยยังจำกัดอยู่เฉพาะบางส่วนของโปรตีน VP1 เท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาโปรตีน VP1, VP2 และ VP3 เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลโปรตีนทั้ง 3 ชนิดของเชื้อ CAV ในประเทศไทย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ที่ระบาดในภาคกลางของประเทศไทยเปรียบเทียบกับเชื้อในต่างประเทศและเชื้อสายพันธุ์วัคซีนในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังโรคโลหิตจางติดต่อนในไก่ของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง

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

การตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR

เตรียม 10% suspension ของอวัยวะภายในบดรวมในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2-7.4 ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำของเหลวใสส่วนบนที่ปั่นแยกได้มาสกัดสารพันธุกรรมชนิด 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 Go Taq 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 Syngene Gel documentation UGenius (FisherScientific, USA) ซึ่งผลบวกจะแสดงแถบ DNA ขนาด 420 bp โดยมีตัวอย่างควบคุมบวกเป็นเชื้อ CAV ที่ยืนยันผลการทดสอบด้วยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) และตัวอย่างควบคุมลบเป็น nuclease-free water

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของฮีน VP1, VP2 และ VP3

คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมจากการตรวจฮีน VP2 ที่ชัดเจนที่สุดฟาร์มละ 1 ตัวอย่างไปวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยการเพิ่มปริมาณฮีน VP1, VP2 และ VP3 จากสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่คัดเลือก โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากเชื้ออ้างอิง Cux-1 ในฐานข้อมูล 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

จากนั้นเตรียมส่วนผสมสำหรับทำ 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

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

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

ในปฏิกิริยารวม 25 µl นำไป run ด้วยเครื่อง T100™ thermal cycler (Biorad, USA) โดยตั้งค่าการทำ 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 Syngene Gel documentation UGenius (FisherScientific, USA)

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 ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 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) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับสาร

พันธุกรรม ABI 3130 DNA genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

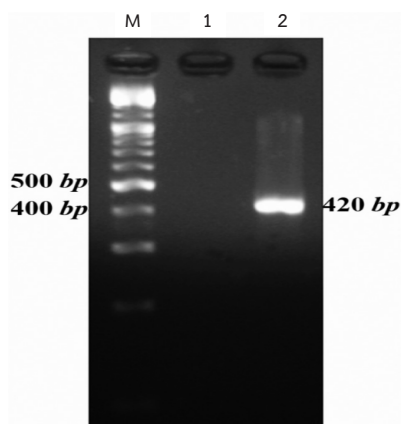
การวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของเชื้อ CAV ด้วยแผนภูมิ phylogenetic tree

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 ร่วมกับการกระจายตัวเกมมา (+G, parameter = 0.05) ตรวจสอบความถูกต้องของแผนภูมิโดยใช้ bootstrap test (1,000 replicates) และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid) ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA X

ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจด้วยวิธี PCR

ตรวจพบผลบวกของยีน VP2 ขนาด 420 bp จากอวัยวะภายในครบทั้ง 15 ตัวอย่าง (รูปที่ 1) ซึ่งการตรวจหาเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR ในปัจจุบัน นิยมใช้การตรวจหา ยีน VP2 เนื่องจากสามารถตรวจพบได้หลังจากการติดเชื้อในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง (Peters *et al.*, 2005, 2006) ในขณะที่ยีน VP1 จะตรวจพบภายหลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Douglas *et al.*, 1995)



รูปที่ 1 ผลการตรวจหาชิ้น VP2 ของเชื้อ CAV จากตัวอย่างอวัยวะภายใน
บตรวมของไก่เนื้อ ด้วยวิธี PCR โดยแถว M แสดง 100 bp molecular
weight marker (Promega, USA), แถว 1 แสดงผลลบต่อชิ้น VP2 และ
แถว 2 แสดงผลบวกต่อชิ้น VP2 ขนาด 420 bp

ผลการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีน VP1, VP2 และ VP3

คัดเลือกตัวอย่างที่พบแถบสารพันธุกรรมชัดเจน
ที่สุดของแต่ละฟาร์ม รวม 7 ตัวอย่าง ไปโคลนเพื่อเพิ่ม
จำนวนยีน VP1, VP2 และ VP3 แล้วตรวจวิเคราะห์รหัส
พันธุกรรมด้วยวิธี DNA sequencing จากการศึกษพบว่า
เชื้อ CAV ที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ยีนยาว
ประมาณ 1,820 นิวคลีโอไทด์ (nt) ในตำแหน่งที่ 380–2199
และมีส่วน ORFs เริ่มจากยีน VP2 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่
380–1,030 (651 nt) ถัดมาเป็นยีน VP3 ซึ่งซ้อนอยู่กับ
ยีน VP2 ในตำแหน่งที่ 486–851 (366 nt) และส่วนท้าย
เป็นยีน VP1 ในตำแหน่งที่ 853–2199 (1349 nt) เช่นเดียว
กับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI, 2000)

เมื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST
โดยการเปรียบเทียบกับเชื้อ CAV ในฐานข้อมูล GenBank
จากตารางที่ 2 พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาทั้งหมดมีค่า
ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide identities)

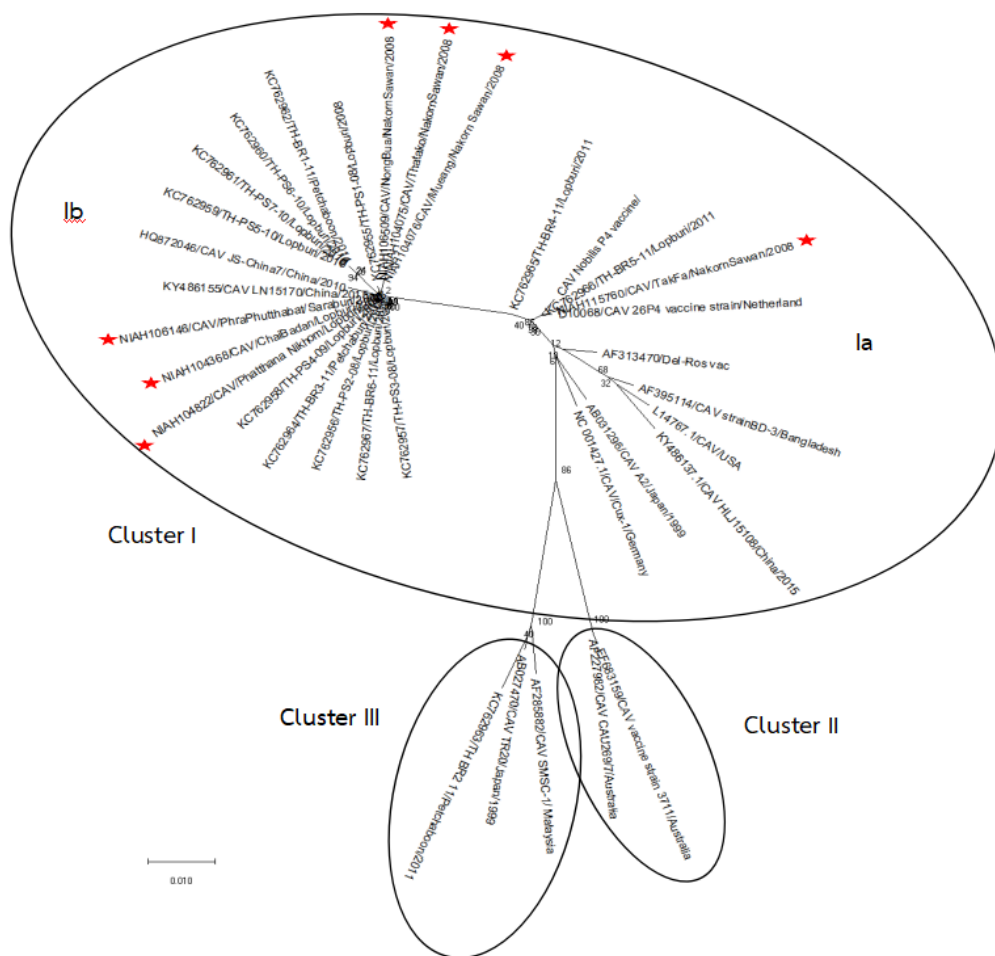
เหมือนกับเชื้อที่พบในประเทศจีนสูงถึง 96–100% เช่น
เดียวกับการศึกษาของ Wanasawaeng *et al.* (2013)
และเหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ประมาณ 94–99% แสดง
ให้เห็นว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ
นิวคลีโอไทด์น้อยมาก

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree

จากรูปที่ 2 พบว่า สามารถจัดกลุ่มเชื้อ CAV ตาม
ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1, VP2
และ VP3 ได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อที่ศึกษามีรหัสพันธุกรรม
ใกล้เคียงกับเชื้อจากประเทศในทวีปเอเชียและเชื้อสายพันธุ์
วัคซีนที่ใช้ในท้องตลาดเช่นเดียวกับการศึกษาของ
Wanasawaeng *et al.* (2013) ซึ่งเชื้อ CAV ในการศึกษา
นี้จัดอยู่ใน cluster I และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก
2 กลุ่ม คือ subgroup Ia และ Ib โดย subgroup Ia
ประกอบด้วยเชื้อ CAV ที่ศึกษาจากฟาร์มใน อ.ตากฟ้า
จ.นครสวรรค์ (NIAH 115760/51) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มย่อย
เดียวกันกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 เชื้อสายพันธุ์วัคซีน Del-Ros
(AF313470) และวัคซีน Nobilis P4 (AJ890284) หรือ
26P4 (D10068) รวมทั้งเชื้อ CAV ที่พบในประเทศจีน
(KY486137) บังกลาเทศ (AF395114) ญี่ปุ่น (AB031296)
สหรัฐอเมริกา (L14767) และเชื้อที่พบในประเทศไทยสายพันธุ์
TH-BR4-11 (KC762965) จากการศึกษาก่อนหน้า
(Wanasawaeng *et al.*, 2013) ส่วน subgroup Ib
ประกอบด้วยเชื้อ CAV ที่ศึกษาจากฟาร์มที่เหลืออีก 6 แห่ง
ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับเชื้อส่วนใหญ่ที่พบใน
ประเทศไทยจากการศึกษาก่อนหน้า (Wanasawaeng *et al.*,
2013) และเชื้อที่พบในประเทศจีนบางสายพันธุ์ (HQ872046
และ KY486155)

ตารางที่ 2 ข้อมูลและค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CAV ที่ศึกษากับเชื้ออ้างอิง Cux-1

รหัส	จังหวัด	อำเภอ	ปีที่พบ (พ.ศ.)	สายพันธุ์	ค่าความเหมือนของ นิวคลีโอไทด์
NIAH 104075/51	นครสวรรค์	ท่าตะโก	2551	CAV/Thatako/NakornSawan/2008	96.29%
NIAH 104076/51	นครสวรรค์	เมือง	2551	CAV/Mueang/NakornSawan/2008	94.04%
NIAH 106509/51	นครสวรรค์	หนองบัว	2551	CAV/NongBua/NakornSawan/2008	96.88%
NIAH 115760/51	นครสวรรค์	ตากฟ้า	2551	CAV/TakFa/NakornSawan/2008	99.38%
NIAH 106146/51	สระบุรี	พระพุทธบาท	2551	CAV/PhraPhutthabat/Saraburi/2008	96.62%
NIAH 104822/51	ลพบุรี	พัฒนานิคม	2551	CAV/PhatthanaNikhom/Lopburi/2008	98.30%
NIAH 104368/52	ลพบุรี	ชัยบาดาล	2552	CAV/ChaiBadan/Lopburi/2009	97.47%



รูปที่ 2 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

นอกจากนี้ พบว่าเชื้อ CAV จากออสเตรเลีย (EF683159 และ AF227982) มีความแตกต่างจากกลุ่มเชื้อข้างต้นจึงจัดอยู่ใน cluster II ในขณะที่เชื้อ CAV จากประเทศมาเลเซีย (AF285882) ญี่ปุ่น (AB027470) และเชื้อที่พบในประเทศไทยสายพันธุ์ TH-BR2-11 (KC762963) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ จัดอยู่ใน cluster III ทั้งนี้ เชื้อ CAV สามารถจัดกลุ่มได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับการออกแบบการวิเคราะห์ผลของผู้วิจัย (Wanasawaeng *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2019) แม้ว่าเชื้อ CAV แต่ละสายพันธุ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่ต่างกันไป แต่ก็ยังถือว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยมาก และเชื้อสายพันธุ์วัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันยังมีความใกล้เคียงกับเชื้อ CAV ที่พบในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ VP1, VP2 และ VP3

ผลการศึกษาพบว่า 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 แห่ง โดยไม่พบการแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 75, 89, 125, 141 และ 144 จากตารางที่ 3 พบกรดอะมิโนชนิด threonine (T) ในตำแหน่งที่ 89 (T89) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ CAV ที่ก่อโรครุนแรง (highly pathogenic) โดยเชื้อ CAV ที่มี arginine (R) ในตำแหน่งที่ 89 (T89R) เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคลดลง (Todd *et al.*, 2002) นอกจากนี้กรดอะมิโนลำดับที่ 139–151 ในบริเวณที่มีความผันแปรสูง (hypervariable region) แสดงถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ (Renshaw *et al.*, 1996) ซึ่งเชื้อ CAV ที่ศึกษามี lysine (K) ในตำแหน่งที่ 139 (K139) เหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ซึ่งสามารถเพิ่ม

จำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดี แต่มี glutamic acid (E) แทน aspartic acid (D) ในตำแหน่งที่ 144 (D144E) เช่นเดียวกับเชื้อ CAV อื่นใน cluster I และ II ส่วนเชื้อที่พบ glutamine (Q) ในตำแหน่งที่ 139 (K139Q) และ 144 (D144Q) เช่น เชื้อใน cluster III จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายต่ำ อีกทั้งพบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี glutamine (Q) ในตำแหน่งที่ 394 (Q394) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 และเชื้อก่อโรคจากรายงานอื่น (Yao *et al.*, 2019) โดยเชื้อที่พบ histidine (H) แทนที่ (Q394H) มักเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ (Yamaguchi *et al.*, 2001) นอกจากนี้ พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษาใน subgroup Ib มี leucine (L) ในตำแหน่งที่ 97 (L97) และ 125 (L125) และพบ histidine (H) ในตำแหน่งที่ 294 (H294) ยกเว้นเชื้อ CAV จาก อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ (NIAH 115760/51) ที่มี methionine (M) ในตำแหน่งที่ 97 (M97) Isoleucine (I) ในตำแหน่งที่ 125 (I125) และ glutamine (Q) ในตำแหน่งที่ 294 (Q294) เหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 และเชื้อสายพันธุ์วัคซีน

ผลการศึกษา VP2 พบว่า เชื้อ CAV ในการศึกษานี้ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเชื้อ CAV สายพันธุ์อื่นมากถึง 98-100% ทั้งนี้ VP2 เป็นโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมาก โดยเฉพาะบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ 94-103 (Peters *et al.*, 2002) โดยพบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี cysteine (C) ในตำแหน่งที่ 95 (C95) และ 97 (C97) และมี lysine (K) ในตำแหน่งที่ 102 (K102) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคของเชื้อไวรัส โดยเชื้อที่มี serine (S) แทน cysteine (C) ในตำแหน่งที่ 95 (C95S) และ 97 (C97S) ร่วมกับมี aspartic acid (D) แทน lysine (K) ที่ตำแหน่ง 102 (K102D) จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคลดลง (Peters *et al.*, 2005) นอกจากนี้ พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามีกรดอะมิโนของ VP2 ทั้ง 216 ตัวเหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 ทุกตำแหน่ง ยกเว้นเชื้อจาก อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี (NIAH 104368/52) ที่พบการแทนที่ของกรดอะมิโนนอก catalytic site 1 แห่ง โดยพบกรดอะมิโนชนิด valine (V) แทน alanine (A) ที่ตำแหน่ง 153 (A153V) เช่นเดียวกับเชื้อ CAV ที่พบใน จ. ลพบุรีและ จ. เพชรบูรณ์ จากรายงานก่อนหน้านี้ (Wanasawaeng *et al.*,

2013) เชื้อสายพันธุ์วัคซีน Del-Ros และเชื้อ CAV ใน Cluster II และ III โดยยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวกับการแสดงออกของเชื้อ CAV

VP3 เป็นโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนน้อยมากเช่นเดียวกับ VP2 โดย VP3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 121 ตัวและมี proline (P) เป็นส่วนประกอบจำนวนมาก (proline rich protein) จากตารางที่ 3 พบว่าเชื้อ CAV ที่ศึกษามี threonine (T) ในตำแหน่งที่ 108 (T108) เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 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 (R) แทนที่ lysine (K) ที่ตำแหน่ง 116 (K116R) และบางสายพันธุ์มี asparagine (N) แทนที่ serine (S) ที่ตำแหน่ง 103 (S103N) และ arginine (R) แทนที่ cysteine (C) ที่ตำแหน่ง 118 (C118R) ทั้งนี้ ยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวกับการแสดงออกของเชื้อ CAV

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ พบว่าการจัดกลุ่มเชื้อ CAV ด้วยการสร้าง phylogenetic tree ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของยีน VP1 เป็นหลัก โดยเชื้อ CAV ที่ศึกษามีรหัสพันธุกรรมเหมือนกับเชื้อที่พบในประเทศจีนสูงถึง 96-100% และเหมือนกับเชื้ออ้างอิง Cux-1 94-99% เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าเชื้อ CAV ที่พบในภาคกลางของประเทศไทย มีกรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญเหมือนกับเชื้อ CAV ที่ก่อโรครุนแรง และมี VP1 แตกต่างจากเชื้ออ้างอิง เชื้อสายพันธุ์วัคซีน และเชื้อที่พบในประเทศอื่น โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 97, 125 และ 294 ทั้งนี้ เชื้อ CAV ที่ศึกษา ทุกสายพันธุ์มีรหัสพันธุกรรมแตกต่างกันน้อยมากและมีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์วัคซีนที่ใช้ในท้องตลาด

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับการถอดมีโนของ VP1, VP2 และ VP3

Code	สายพันธุ์	การถอดมีโนของ VP1														การถอดมีโนของ VP2										การถอดมีโนของ VP3												
		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																																						
NC_001427	Cux-1/ Germany	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			
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	.	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	F	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.			
NIAH104076/51	Mueang/ NakornSawan/2008	A	.	.	L	L	.	.	E	M	F	R	E	T	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.			
NIAH106509/51	NongBua/Nakorn Sawan/2008	A	.	.	L	L	.	.	E	M	F	R	E	.	T	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.			
NIAH106146/51	PhraPhutthabat/ Saraburi/2008	A	.	.	L	L	.	.	E	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.			
NIAH104822/51	Phatthanakhom/ Lopburi/2008	A	.	.	L	L	.	.	E	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.			
NIAH104368/52	ChaiBadary/Lopburi/2009	A	.	.	L	L	.	.	E	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C			
HO872046	J5-China7/China/2010	A	.	.	L	L	.	.	E	M	.	R	E	.	S	P	H	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C			
KC762955	TH-PS1-08/ Lopburi/2008	A	L	.	L	L	.	.	.	M	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C				
KC762958	TH-PS4-09/ Lopburi/2009	A	.	.	L	L	.	.	.	M	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C				
KC762961	TH-PS7-10/ Lopburi/2010	A	.	.	L	L	.	.	.	M	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	R	C				
KC762964	TH-BR3-11/ Petchaboon/2011	A	.	.	L	L	.	.	.	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			

หมายเหตุ . หมายถึง มีการถอดมีโนเหมือนเชื้ออ้างอิง Cux-1, - หมายถึง ไม่ทราบข้อมูล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มไวรัสวิทยาและกลุ่มระบาดวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและสนับสนุนข้อมูลประกอบการวิเคราะห์ ขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดที่เกี่ยวข้องสำหรับการประสานงานและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ ขอขอบคุณเกษตรกรฟาร์มและศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง จ.พิษณุโลก สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

- นำดี แซ่เฮง นรินทร์ อุประกรินทร์ ภัทรา มูลจิตร และวรวิทย์ วัชวัลคุ. 2544 (2001). การติดเชื้อโลหิตจากในไก่แบบถาวร. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. หน้า 494-498.
- อุราศรี ดันตสวัสดิ์ พรทิพย์ ศิริวรรณ และ อรุณี ชัยสิงห์. 2539 (1996). การศึกษาเชื้อไวรัสโลหิตจากติดต่อในไก่ทางไวรัสวิทยาและชีรั่ววิทยา. 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.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2000. Chicken anemia virus, complete genome NCBI Reference Sequence: NC_001427.1. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001427.1/. [1 March 2019]
- Noteborn, M.H., Todd, D., Verschueren, 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., Verschueren, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.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), 1-18.
- Yausa, N., Taniguchi, T. and Yoshida, I. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Aviandis.* 366-385.