

MỘT SỐ CHỈ TIÊU LÂM SÀNG, PHI LÂM SÀNG VÀ BIẾN ĐỔI BỆNH LÝ ĐẠI THỂ CỦA GÀ NHIỄM VIRUS GÂY BỆNH THIẾU MÁU TRUYỀN NHIỄM (CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS, CIAV) TRONG ĐIỀU KIỆN THÍ NGHIỆM

Đào Đoàn Trang³, Nguyễn Văn Giáp^{1*}, Lê Thị Trinh², Trương Hà Thái¹,
Lại Thị Lan Hương¹, Cao Thị Bích Phượng¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, ²Công ty cổ phần Thú y xanh (Greenvet)
³Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi

*Tác giả liên hệ: nvgiap@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 31.07.2019

Ngày chấp nhận đăng: 20.09.2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin về một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý của gà được gây nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (CIAV). Bằng phương pháp tiêm huyết dịch virus với liều 10^4 TCID₅₀/mL, đã nhiễm thành công CIAV cho gà 1 tuần tuổi. Hiện tượng virus huyết bắt đầu xuất hiện tại thời điểm 3 tuần sau gây nhiễm (20,0%) sau đó tăng dần và đạt 100% từ tuần thứ 6. Trong điều kiện thực nghiệm, gà nhiễm CIAV không có triệu chứng điển hình của bệnh thiếu máu truyền nhiễm như ngoài tự nhiên. Nhóm gà nhiễm CIAV có xu hướng tăng khối lượng chậm hơn, có khối lượng thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng bắt đầu từ tuần thứ 5 sau nhiễm virus. Tỷ khối huyết cầu trung bình của nhóm dương tính CIAV lúc 8 tuần sau gây nhiễm nhỏ hơn 27% và thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng. Nhóm gà nhiễm CIAV có bệnh tích của bệnh thiếu máu truyền nhiễm, điển hình là: tủy xương nhạt màu (77,8%), teo tuyến ức (33,3%), teo túi Fabricius (55,6%). Kết quả thu được từ nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học giúp chẩn đoán phân biệt bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở đàn gà nuôi tại Việt Nam.

Từ khóa: Gà, virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm, gây bệnh thực nghiệm.

Clinical and Non-Clinical Characteristics and Gross Lesions of Chickens Infected by Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV) under Experimental Condition

ABSTRACT

This study was conducted to reveal the clinical and non-clinical characteristics as well as gross lesions of chickens infected by chicken infectious anemia virus (CIAV) under an experimental condition. Via intra-abdominal inoculation of the virus at a dose of 10^4 TCID₅₀/mL, one-week old chickens were successfully infected by the field strain of CIAV with the viremia appeared at 3 weeks postinfection (20.0%) and reached 100% at the sixth week postinfection. Under the current condition, viremic CIAV chickens exhibited minimum clinical signs. From the fifth week after infection, CIAV infected group exhibited a reduction in the growth rate and had significantly lower body weight than that of the control group. Additionally, at eighth week postinfection, the packed cell volume of CIAV positive group was less than 27% and was significantly lower than the control group. The chickens of the experimental group had compatible gross lesions of anemia, such as pale of bone marrow (77.8%) and atrophy of primary lymphoid organs (bursa of Fabricius and thymus, 33.3% and 55.6%, respectively). The results of this study appeared helpful for differential diagnosis of chicken infectious anemia in the field.

Keywords: Chicken, chicken infectious anemia virus, experimental infection.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà là một bệnh do virus có tên tiếng Anh là *Chicken*

Infectious Anemia Virus (CIAV) gây ra. Trên thế giới, bệnh đã được biết đến từ lâu (Yuasa & cs., 1979) và phổ biến ở nhiều nước thuộc châu Á, châu Âu và châu Mỹ (Olszewska-Tomczyk &

cs., 2016; McNulty, 1991; van Santen & cs., 2001; Kye & cs., 2013; Zhou & cs., 1997). Bệnh gây thiệt hại cho chăn nuôi gà ở nhiều mặt, ví dụ như: tăng tỷ lệ tiêu tốn thức ăn (FCR tăng 2%), giảm tỷ lệ tăng trọng khoảng 2,5% (McNulty, 1991). Gà mắc bệnh, đặc biệt là giai đoạn <3 tuần tuổi có tỷ lệ chết từ 10-20% (McNulty, 1991), thậm chí lên tới 50% trong một số điều kiện thí nghiệm (Yuasa & cs., 1979). Do đặc điểm ức chế miễn dịch, virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm không những làm giảm hiệu lực của vacxin phòng bệnh (Sun & cs., 2009), mà còn hiệp đồng làm trầm trọng hơn nhiều tình trạng bệnh như bệnh Gumboro và Marek's,... (Yuasa & cs., 1980; Miles & cs., 2001; Subler & cs., 2006). Về mặt lâm sàng, biểu hiện đặc trưng của bệnh là tình trạng thiếu máu không tái tạo (aplastic anemia) do sự phá hủy các tế bào tạo máu (hematopoietic stem cell) ở tủy xương và thoái hóa các mô lympho (McNulty, 1991).

Ở Việt Nam, bằng chứng đầu tiên về sự có mặt của CIAV được công bố vào năm 2015 dựa vào kết quả phát hiện kháng thể kháng CIAV ở mẫu huyết thanh gà thu tại Hà Nội và Hà Nam năm 2013 (Trinh & cs., 2015). Tiếp sau đó, một số nghiên cứu đã được thực hiện và cho biết CIAV lưu hành rất phổ biến ở các tỉnh miền Bắc với tỷ lệ dương tính với virus từ 47,6% (Van Dong & cs., 2019) đến 62,2% (Huynh & cs., 2019). Các nghiên cứu này đều khẳng định CIAV lưu hành ở các tỉnh miền Bắc không phải là chủng virus vacxin (Đào Đoàn Trang & cs., 2018; Huynh & cs., 2019) và mang đặc điểm gen của chủng virus có độc lực (Huynh & cs., 2019). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào công bố nào về đặc điểm bệnh lý của gà mắc bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở ngoài tự nhiên cũng như trong phòng thí nghiệm. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin về một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà khi được gây nhiễm thực nghiệm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm. Các kết quả thu được sẽ góp phần làm rõ khả năng gây bệnh của chủng CIAV lưu hành tại thực địa và là cơ sở giúp chẩn đoán phân biệt bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà nuôi tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- *Huyền dịch virus dùng gây nhiễm*: CIAV được phân lập từ gà mắc bệnh tự nhiên trên môi trường tế bào MSB1, theo phương pháp được công bố trước đây (Yuasa & cs., 1983). Huyền dịch bệnh phẩm 10% dùng phân lập virus là mẫu gộp phủ tạng (gan, lách, thận, tuyến ức, tủy xương và túi Fabricius) đã được bất hoạt virus có vỏ bọc (nếu có) bằng chloroform (tỷ lệ 1 mL huyền dịch và 50 μ L chloroform) ở nhiệt độ phòng trong 10 phút (Allan & cs., 1999). Huyền dịch virus phân lập được khẳng định là CIAV bằng phản ứng PCR (van Santen & cs., 2001) với cặp mồi đặc hiệu trình bày dưới đây. CIAV phân lập được âm tính với virus: Newcastle, cúm gia cầm, Gumboro, IB, ILT (kết quả không trình bày).

- *Gà thí nghiệm*: Trứng gà có phôi được lấy từ đàn gà âm tính CIAV, chưa từng được tiêm vacxin phòng bệnh thiếu máu truyền nhiễm. Trứng được ấp nở tại phòng thí nghiệm, gà con 1 ngày tuổi được kiểm tra âm tính CIAV bằng phản ứng semi-nested PCR.

- *Mồi đặc hiệu*: mồi được chọn dựa theo nghiên cứu trước đây (van Santen & cs., 2001), có trình tự (5'-3') như sau: CAVVP3F (TTA AGA TGG ACG CTC TCC AAG AAG ATA CT), CAV1 (GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C) và CAV2 (GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC). Sản phẩm PCR của cặp mồi CAVVP3F/CAV2 và CAV1/CAV2 có kích thước lần lượt 1038 bp và 676 bp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm và lấy mẫu

Tổng số có 20 gà 1 ngày tuổi âm tính CIAV, được chia thành 2 nhóm. Nhóm thí nghiệm: 10 gà, được tiêm 1 mL huyền dịch CIAV ($10^{4,0}$ TCID₅₀/mL) vào xoang phúc mạc, 7 ngày sau tiêm nhắc lại lần 2. Nhóm đối chứng: 10 gà được tiêm 1 mL dung dịch PBS 1x vào xoang phúc mạc. Liều gây nhiễm được chọn dựa vào (i) liều nhiễm từ $10^{4,0}$ TCID₅₀/mL cho đến $2 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/mL của một số nghiên cứu đã công bố

Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (Chicken Infectious Anemia Virus, CIAV) trong điều kiện thí nghiệm

(Kaffashi & cs., 2006; Wani & cs., 2015; Tongkamsai & cs., 2019) và (ii) kết quả gây nhiễm thử được thực hiện một số lần trước đó bởi nhóm tác giả.

Gà của nhóm thí nghiệm và đối chứng được nuôi riêng biệt, cách ly hoàn toàn với nhau và được cho ăn, uống tự do trong thời gian nuôi thí nghiệm (8 tuần). Để chứng minh việc gây nhiễm CIAV thành công, lấy mẫu máu chất huyết thanh từ tuần 1 đến tuần 8 sau gây nhiễm, lấy mẫu 1 tuần/lần.

2.4.2. Tách chiết ADN

ADN tổng số được tách chiết từ huyền dịch bệnh phẩm 10% hoặc huyết thanh theo quy trình được mô tả trước đây (Yang & cs., 2003). Các bước chính gồm (i) ly giải mẫu bằng proteinase K và lysis buffer, (ii) tách pha ADN bằng phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1), (iii) rửa và rửa ADN lần lượt bằng 2-propanol và ethanol 75%, (iv) hoàn nguyên ADN bằng 30 μ L dung dịch đệm TE (pH 8,0).

2.4.3. Phát hiện CIAV bằng semi-nested PCR

Thành phần phản ứng PCR (2X PCR Master mix Solution, iNtRON, 25166) được trộn theo hướng dẫn, trong đó: 16 μ L nước, 1 μ L mỗi loại môi (pha ở nồng độ 10 pmol), 1 μ L ADN mẫu tách chiết. Chu trình nhiệt phản ứng PCR dùng 3 mỗi CAVP3F/CAV1/CAV2 gồm: tiền biến tính ở 94°C trong 5 phút; theo sau bởi 40 chu kỳ nhiệt bao gồm biến tính 94°C/20 giây, bắt mỗi 57°C/30 giây, kéo dài 72°C/60 giây; giữ ở nhiệt độ 25°C cho tới khi dừng. Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 2%, bổ sung thuốc nhuộm ADN (RedSafe Nucleic Acid Staining Solution, iNtRON, 21141).

2.4.4. Theo dõi khả năng tăng trọng ở gà sau nhiễm CIAV

Khối lượng của gà được theo dõi bằng phương pháp cân. Dùng cân điện tử cân khối lượng từng cá thể vào buổi sáng trước khi cho ăn. Thực hiện với tần suất 1 lần/tuần và từ tuần 1 đến tuần 8. Tính khối lượng trung bình và độ lệch chuẩn của mỗi nhóm tại từng thời điểm cân và dùng giá trị này để so sánh giữa nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm.

2.4.5. Xác định tỷ khối huyết cầu ở gà sau nhiễm CIAV

Tỷ khối huyết cầu (%) của từng cá thể trong mỗi nhóm thí nghiệm và đối chứng được xác định hàng tuần. Các bước thực hiện được tóm tắt như sau. Lấy máu tĩnh mạch cổ (gà <2 tuần tuổi) hoặc tĩnh mạch cánh vào buổi sáng trước khi cho ăn, mỗi con 0,5 mL. Máu được cho vào ống có chất chống đông EDTA. Hút máu vào ống mao quản, bịt chặt 1 đầu ống bằng đất sét chuyên dụng. Mối tương quan giữa lực ly tâm và thời gian ly tâm được xác định theo công thức: thời gian ly tâm (phút) = 100.000/lực ly tâm (RCF). Ống mao quản được ly tâm ở tốc độ 10.000 xg, trong vòng 10 phút ở 25°C. Sau khi ly tâm, máu sẽ tách được 2 phần: phần trên lỏng là huyết tương, phần dưới đặc bao gồm tất cả các tế bào máu. Dùng thước đo chuyên dụng (Janetzki) để xác định chiều cao của cột hồng cầu (tỷ lệ phần trăm giữa thể tích khối hồng cầu và máu toàn phần).

2.4.6. Xử lý số liệu

Số liệu được tính bằng phần mềm Excel 2010. Kiểm định sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm bằng phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) bằng chương trình Minitab 16. Sự sai khác giữa các công thức được coi là có ý nghĩa thống kê nếu $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả gây nhiễm CIAV thực nghiệm

Sau gây nhiễm, mẫu máu được thu định kỳ để kiểm tra virus huyết. Kết quả semi-nested PCR phát hiện virus huyết tại thời điểm 4 tuần sau gây nhiễm cho thấy chỉ có 5/9 gà được tiêm virus có hiện tượng virus huyết (giống số 1, 2, 5, 7 và 8, Hình 1).

Kết quả phát hiện CIAV trong máu gà 8 tuần sau gây nhiễm (Bảng 1) cho thấy: Bằng phương pháp semi-nested PCR, nghiên cứu này không phát hiện được CIAV ở máu của gà nhóm gây nhiễm trong 2 tuần đầu. Hiện tượng virus huyết bắt đầu xuất hiện ở tuần thứ 3 sau gây nhiễm (tỷ lệ 20,0%) và tăng dần cho đến tuần

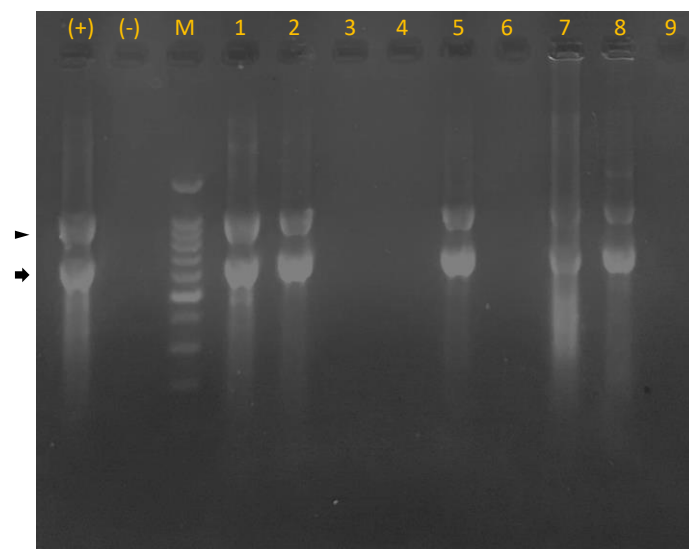
thứ 6 (100%). Virus huyết duy trì tới tuần thứ 8 (thời điểm dừng thí nghiệm). Ở nhóm đối chứng (không gây nhiễm virus), trong toàn bộ thời gian thí nghiệm (tuần 1 - tuần 8) đều không phát hiện được virus trong máu, kể cả ở 1 gà chết ở tuần thứ 6.

Trong nhiều nghiên cứu gây bệnh thực nghiệm trên thế giới, tại mỗi thời điểm cố định sau gây nhiễm đều mổ khám và kiểm tra virus ở các cơ quan nội tạng (Tan & Tannock, 2005; Cardona & cs., 2000; Toro & cs., 1997). Để hạn chế số lượng động vật thí nghiệm, nghiên cứu này dùng chỉ tiêu virus huyết để đánh giá sự thành công của gây nhiễm và mổ khám kiểm tra bệnh tích tại thời điểm kết thúc thí nghiệm. Đối với bệnh thiếu máu truyền nhiễm, lứa tuổi mãn cảm nhất và thường biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở nhóm gà ≤ 3 tuần tuổi (McNulty, 1991). Mặc dù vậy, hiện tượng nhiễm CIAV có thể xảy ra ở gà mọi lứa tuổi, với khả năng nhân lên của virus ở gà 1 ngày tuổi và 6 tuần tuổi được xác định là tương đương (Kaffashi & cs., 2006). Trong nghiên cứu này, gà được gây nhiễm virus vào giai đoạn mãn cảm, tuy nhiên hiện tượng virus huyết xuất hiện tương đối muộn so với nhiều công bố trước đây. Ví dụ, thí nghiệm gây nhiễm cho gà 1 ngày tuổi qua đường tiêm bắp,

sau 5 ngày hoặc 7 ngày đã phát hiện CIAV ở trong máu (Toro & cs., 1997; Tan & Tannock, 2005). Đối với vaccin CIAV nhược độc, sau khi tiêm cho gà 23 tuần tuổi có thể phát hiện virus huyết (với lượng thấp hơn so với các cơ quan nội tạng) sau 7 ngày (Vagnozzi & cs., 2018). Nguyên nhân dẫn tới sự sai khác về thời điểm xuất hiện virus huyết ở nghiên cứu này so với một số nghiên cứu sử dụng đường gây nhiễm tương tự (Tan & Tannock, 2005; Toro & cs., 1997) chưa được làm rõ. Mặc dù xuất hiện muộn, hiện tượng virus huyết ở tuần thứ 3 sau gây nhiễm với tỷ lệ tăng dần và duy trì cho tới thời điểm dừng thí nghiệm chứng tỏ đã gây nhiễm thực nghiệm thành công chủng CIAV thực địa cho gà 1 tuần tuổi.

3.2. Một số chỉ tiêu lâm sàng của gà nhiễm CIAV

Ở Việt Nam, mặc dù CIAV được chứng minh lưu hành rất phổ biến ở các tỉnh miền Bắc (Đào Đoàn Trang & cs., 2018; Huỳnh & cs., 2019; Van Dong & cs., 2019) nhưng chưa có nhiều thông tin về triệu chứng, bệnh tích của gà nhiễm CIAV. Vì vậy, chúng tôi theo dõi một số chỉ tiêu lâm sàng của gà được gây nhiễm thành công CIAV.



Ghi chú: Đối chứng dương (+) và đối chứng âm (-) của phản ứng PCR, thang 100 bp ADN (M), giếng ký hiệu từ 1-9 là các mẫu xét nghiệm. Sản phẩm PCR của cặp mồi CAVVP3F/CAV2 (đầu mũi tên) và CAV1/CAV2 (mũi tên) có kích thước lần lượt là 1038 bp và 676 bp

Hình 1. Kết quả semi-nested PCR phát hiện CIAV ở nhóm gà gây nhiễm

Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (Chicken Infectious Anemia Virus, CIAV) trong điều kiện thí nghiệm

Bảng 1. Kết quả phát hiện virus huyết ở gà sau gây nhiễm

Nhóm	Tuổi gà (ngày)	Thời gian sau gây nhiễm (tuần)	Số mẫu kiểm tra*	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
Đối chứng	9	1	10	0	0
	16	2	10	0	0
	23	3	10	0	0
	30	4	10	0	0
	37	5	10	0	0
	44	6	9	0	0
	51	7	9	0	0
	56	8	9	0	0
Thí nghiệm	9	1	10	0	0
	16	2	10	0	0
	23	3	10	2	20,0
	30	4	9	5	55,6
	37	5	9	7	77,8
	44	6	9	9	100
	51	7	9	9	100
	56	8	9	9	100

Ghi chú: * 1 gà nhóm đối chứng chết ở tuần thứ 6, 1 gà nhóm thí nghiệm chết ở tuần thứ 4.



Hình 2. Màu của mào gà ở thời điểm sau gây nhiễm CIAV 6 tuần

Biểu hiện lâm sàng của hiện tượng thiếu máu ở gà thường xuất hiện trong tuần thứ 2 đến tuần thứ 3 sau gây nhiễm (Yuasa & cs., 1979; McNulty, 1991; Tan & Tannock, 2005). Do đó, nghiên cứu này tập trung quan sát triệu chứng lâm sàng của gà tại thời điểm 6 tuần tuổi (2 tuần sau khi bắt đầu có hiện tượng virus huyết và là thời điểm 100% gà gây nhiễm dương tính virus huyết). Trong suốt quá trình theo dõi, hầu như không quan sát được triệu chứng thiếu máu của

gà nhiễm virus thực nghiệm. Ví dụ ở hình 2, không thấy khác biệt về màu sắc mào của nhóm gà thí nghiệm và đối chứng. Ở một số nghiên cứu gây nhiễm CIAV qua đường tiêm bắp, ngoài hiện tượng chết, gà thí nghiệm mắc bệnh thiếu máu truyền nhiễm có biểu hiện ủ rũ, bỏ ăn, xù lông và mào yếm nhợt nhạt (Yuasa & cs., 1979; Tan & Tannock, 2005). Ngược lại, kết quả gây nhiễm đơn CIAV (chủng CAA 1/80) qua đường tiêm phúc mạc cho thấy gà thí nghiệm không có triệu

chứng lâm sàng, chỉ có thay đổi chỉ tiêu huyết học và biến đổi bệnh lý điển hình của bệnh (Engström & cs., 1988). Vẫn dùng chủng CAA 1/80 để nhiễm đồng thời với reovirus (chủng Reo 1/80), gà thí nghiệm biểu hiện triệu chứng như lười vận động, xù lông và chết (Engström & cs., 1988). Có thể nhận xét rằng: Trong điều kiện thí nghiệm, triệu chứng của bệnh thiếu máu truyền nhiễm còn phụ thuộc vào hiện tượng đồng nhiễm. Như vậy, việc không quan sát được triệu chứng lâm sàng ở gà nhiễm CIAV trong nghiên cứu này không phải là trường hợp đặc biệt.

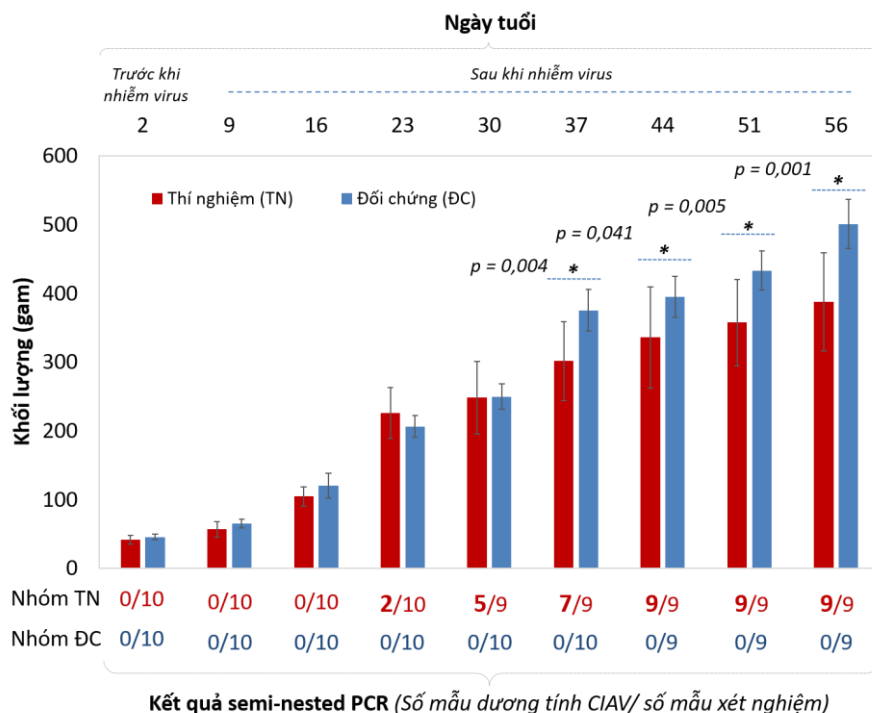
Trong thực tế, gà nhiễm CIAV có một số triệu chứng liên quan đến thiếu máu như: mào tích nhợt nhạt, xuất huyết ở da cánh,... (Goryo & cs., 1989; Buscaglia & cs., 1994; Rozypal & cs., 1997; Ledesma & cs., 2001; Toro & cs., 1997; Zhou & cs., 1997). Theo một số bài nghiên cứu tổng hợp, bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà thường biểu hiện nặng nhất khi nhiễm ghép với một số mầm bệnh khác như: Avian Reoviruses, Avian Adenoviruses, Reticuloendotheliosis virus, Marek's disease virus, hoặc virus gây

bệnh Gumboro (McNeilly & cs., 1995; Yuasa & cs., 1980). Vì vậy, ở điều kiện thí nghiệm, khi gà chỉ nhiễm CIAV có thể không có những triệu chứng giống như ngoài tự nhiên.

3.3. Khả năng tăng trọng của gà nhiễm CIAV

Ngoài gây thiếu máu, gà nhiễm CIAV còn giảm sức sinh trưởng (Tan & Tannock, 2005), do đó khối lượng của gà được theo dõi hàng tuần sau gây nhiễm để lượng hóa ảnh hưởng này.

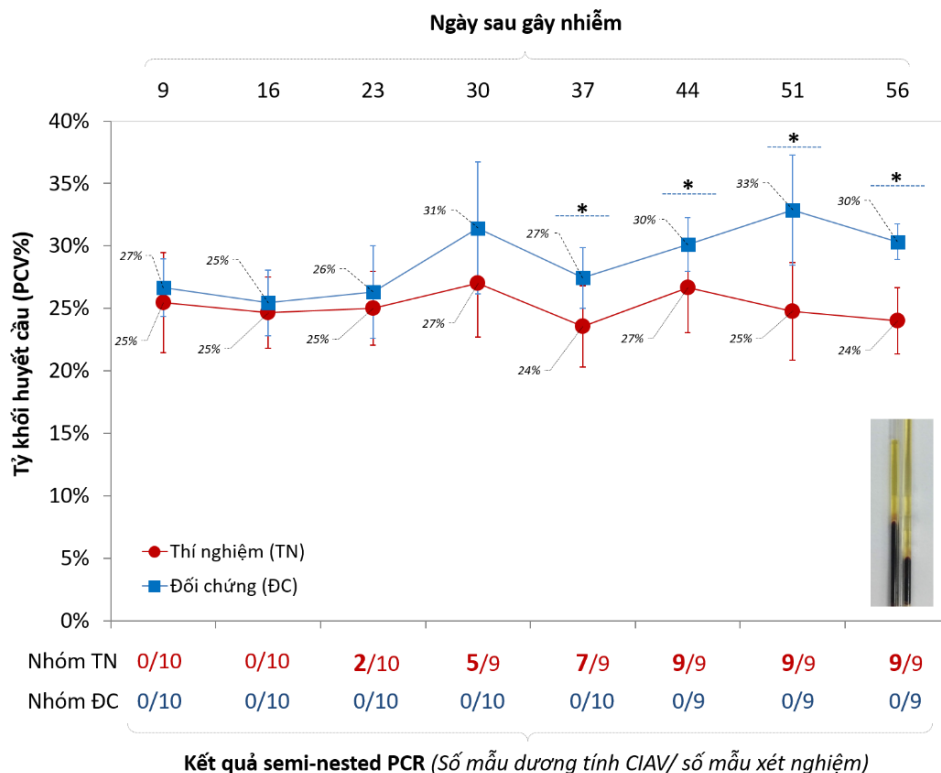
Gà nhóm thí nghiệm (gây nhiễm CIAV) và nhóm đối chứng (không gây nhiễm CIAV) đều tăng khối lượng qua các mốc thời gian theo dõi (Hình 3). Từ 1-4 tuần sau gây nhiễm (9-30 ngày tuổi), gà thuộc nhóm thí nghiệm và đối chứng có sự chênh lệch về khối lượng, nhưng sự khác biệt trong giai đoạn này không có ý nghĩa thống kê (khoảng tin cậy 95% giao nhau, Hình 3). Từ tuần thứ 5 sau gây nhiễm (thời điểm có từ >70% đến 100% gà dương tính virus huyết), nhóm nhiễm virus có khối lượng thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng (dấu *, Hình 3).



Ghi chú: Khối lượng được tính trung bình cho nhóm (biểu diễn dưới dạng cột) và biên độ dao động của khối lượng (biểu diễn dưới dạng đoạn thẳng). Dấu * biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Hình 3. Khối lượng trung bình của lô gà nhiễm CIAV và đối chứng

Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (Chicken Infectious Anemia Virus, CIAV) trong điều kiện thí nghiệm



Ghi chú: Tại mỗi thời điểm, tỷ khối huyết cầu được biểu diễn dưới dạng trung bình cho nhóm và biên độ dao động. Dấu * biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Hình 4. Biến động tỷ khối huyết cầu ở nhóm gà gây nhiễm và đối chứng

Bằng gây nhiễm thực nghiệm, ảnh hưởng của CIAV tới tăng khối lượng của gà được thể hiện rõ nhất sau gây nhiễm 2-3 tuần: nhóm gây nhiễm là 85 ± 8 và 94 ± 33 g; nhóm đối chứng là 139 ± 11 và 163 ± 27 g (Goryo & cs., 1989). So với kết quả nghiên cứu này thì ảnh hưởng của CIAV tới tăng khối lượng của gà mới thực sự rõ vào tuần thứ 6 đến tuần thứ 8 sau gây nhiễm. Sự sai khác về thời điểm nhiễm CIAV ảnh hưởng tới tăng khối lượng của gà như đã nêu có thể được giải thích bởi hiện tượng virus huyết xuất hiện tương đối muộn ở nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu trình bày ở hình 3 cho biết CIAV thực sự ảnh hưởng tới mức tăng khối lượng của gà thí nghiệm. Kết hợp với kết quả nghiên cứu về triệu chứng lâm sàng và so sánh với nhóm gà đối chứng, có thể rút ra nhận xét: trong điều kiện thí nghiệm, gà nhiễm CIAV mặc dù ít biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh nhưng vẫn có thể đo lường tác hại qua chỉ tiêu phi lâm sàng, ví dụ như mức tăng khối lượng.

3.4. Biến động tỷ khối huyết cầu ở gà gây nhiễm CIAV

CIAV nhân lên và phá hủy các tế bào tạo máu ở tủy xương, dẫn tới giảm số lượng hồng cầu. Để lượng hóa ảnh hưởng của hiện tượng nhiễm CIAV, một chỉ tiêu cần theo dõi là tỷ khối huyết cầu ở các thời điểm sau gây nhiễm. Tỷ khối huyết cầu của gà là khác nhau giữa các giống (Goodwin & cs., 1992a) và thay đổi theo lứa tuổi (Goodwin & cs., 1992b). Vì vậy, cần căn cứ vào các yếu tố kể trên để đưa ra ngưỡng tỷ khối huyết cầu chỉ thị cho thiếu máu (Goodwin & cs., 1991; Goodwin & cs., 1992b). Mặc dù vậy, nhiều nghiên cứu không tuân theo khuyến cáo nêu trên khi xác định giá trị tỷ khối huyết cầu để đánh giá hiện tượng thiếu máu ở gà bệnh (Aly, 2001; Hegazy & cs., 2014; Tan & Tannock, 2005; Tongkamsai & cs., 2019; van Santen & cs., 2004; Wani & cs., 2014). Nhận biết được các chú ý quan trọng đó, biến động về tỷ khối huyết cầu trong nghiên cứu này không dùng để đánh

giá hiện tượng thiếu máu (do gây nhiễm virus cho giống gà Hisex white) mà để chứng minh có hay không có sự khác biệt giữa nhóm gà nhiễm CIAV và nhóm gà không nhiễm CIAV.

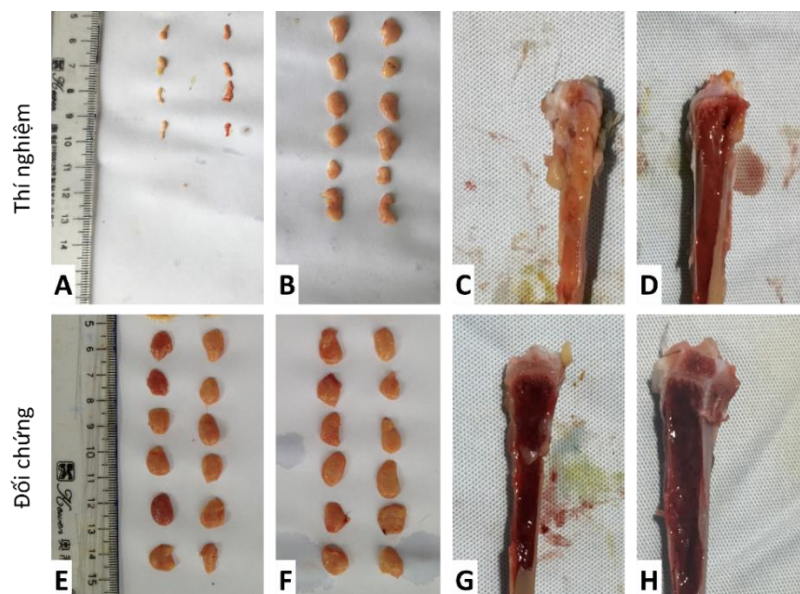
Tại thời điểm 1 tuần sau gây nhiễm CIAV, tỷ khối huyết cầu trung bình của nhóm gây nhiễm CIAV thấp hơn nhóm đối chứng, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Dựa vào kết quả PCR, sau gây nhiễm 3 tuần bắt đầu phát hiện gà dương tính với CIAV, tỷ khối huyết cầu từ thời điểm này ở nhóm thí nghiệm bắt đầu giảm nhiều so với nhóm đối chứng. Từ tuần 5 sau gây nhiễm trở đi, kết quả kiểm định về sự khác biệt tỷ khối huyết cầu giữa 2 nhóm gà cho giá trị $P < 0,05$, chứng tỏ sự sai khác là có ý nghĩa thống kê. Trong đó, thấy rõ nhóm gà nhiễm CIAV có tỷ khối huyết cầu thấp hơn rõ rệt so với nhóm gà đối chứng (các vị trí đánh dấu *, Hình 4).

Về thời điểm, các kết quả gây bệnh thực nghiệm cho biết biểu hiện thiếu máu (đánh giá qua chỉ tiêu bệnh lý vi thể hoặc tỷ khối huyết cầu) bắt đầu xuất hiện trong tuần thứ nhất sau gây nhiễm, tiến triển nặng dần và nặng nhất sau khi nhiễm virus 2-3 tuần (Yuasa & cs., 1979). Trong một số trường hợp, sự thay đổi chỉ số huyết học có thể xảy ra sớm, khoảng 8 ngày sau gây nhiễm virus (McNulty, 1991). Đối chiếu thời điểm bắt đầu xuất hiện hiện tượng virus

huyết ở nhóm gà gây nhiễm (Bảng 1) với thời điểm tỷ khối huyết cầu có sự khác biệt giữa nhóm thí nghiệm và đối chứng (Hình 4) có thể thấy độ trễ là 2 tuần. Ở khía cạnh này, kết quả trên phù hợp với các mô tả trước đây.

3.5. Biến đổi bệnh lý đại thể ở gà được gây nhiễm CIAV

Tại thời điểm hiện tượng thiếu máu là khác biệt rõ rệt nhất giữa nhóm thí nghiệm và đối chứng (ngày 56 sau nhiễm virus, Hình 4), toàn bộ gà của 2 nhóm được mổ khám để nghiên cứu biến đổi bệnh lý đại thể. Biến đổi bệnh lý đại thể được trình bày ở hình 5 và 6 là cơ quan tạo máu, mô lympho tập trung và vị trí có biến đổi bệnh lý. Hình 5 cho biết các thùy của tuyến ức ở nhóm gà đối chứng có kích thước tương đối đồng đều (Hình 5E, 5F), trong khi đó kích thước của các thùy này của nhóm thí nghiệm có sự teo một phần (Hình 5B) hoặc teo gần như hoàn toàn (Hình 5A). Tủy xương ở nhóm thí nghiệm nhạt màu (Hình 5D) hoặc có màu vàng rõ (Hình 5C). Ngược lại, tủy xương của nhóm gà đối chứng luôn có màu đỏ nâu (Hình 5G, 5H). Như vậy, gà được gây nhiễm bởi chủng CIAV thực địa trong nghiên cứu này có biến đổi bệnh tích điển hình của bệnh thiếu máu truyền nhiễm, giống như mô tả của nhiều nghiên cứu trên thế giới (Yuasa & cs., 1979; Yuasa & cs., 1980).



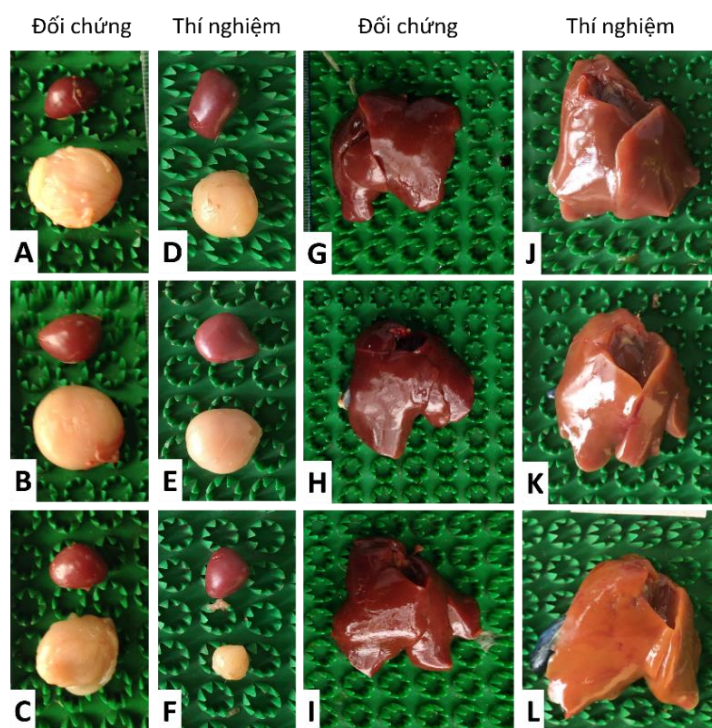
Hình 5. Bệnh tích của nhóm thí nghiệm và đối chứng ở tuyến ức và tủy xương

Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (Chicken Infectious Anemia Virus, CIAV) trong điều kiện thí nghiệm

Trong trạng thái sinh lý bình thường, tuyến ức và túi Fabricius teo nhỏ/ thoái hóa khi gà >13 tuần tuổi (Tarek & cs., 2012). Hiện tượng teo túi Fabricius ở gà <13 tuần tuổi có thể quan sát rõ ràng khi so sánh kích thước với lách. Ở nhóm gà nhiễm CIAV, ngoài tuyến ức, túi Fabricius cũng là cơ quan có biến đổi rõ với hiện tượng teo nhỏ (Hình 6A-6F).

Hình 6A-6C cho thấy kích thước túi Fabricius của nhóm gà đối chứng luôn lớn gấp 3 lần so với kích thước lách. Ngược lại, ở nhóm gà nhiễm CIAV, kích thước tương đối, túi Fabricius so với kích thước của lách chỉ gấp khoảng 1,5 lần (Hình 6D, 6E), thậm chí là nhỏ hơn (Hình 6F). Kết quả trên cho thấy túi Fabricius ở nhóm gà

thí nghiệm đã teo nhỏ. Hiện tượng thoái hóa/teo nhỏ của tuyến ức và túi Fabricius ở gà nhiễm CIAV có thể được giải thích là do virus có thể nhân lên ở nhiều loại tế bào của gà mẫn cảm, trong đó có các tế bào tiền lympho T (Adair, 2000). Ngoài các cơ quan kể trên, khi đối chiếu màu gan giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng, có thể thấy rõ màu gan vàng hơn ở nhóm thí nghiệm (Hình 6J-6L) so với nhóm đối chứng (Hình 6G-6I). Kết quả này phản ánh tình trạng thiếu máu, dẫn tới nhạt màu của một số cơ quan nội tạng, nhất là gan. Trong quá trình mổ khám, ngoài các cơ quan kể trên, hầu hết các hệ cơ quan khác của gà nhiễm CIAV đều không có biến đổi bệnh tích đại thể rõ so với nhóm đối chứng.



Hình 6. Bệnh tích của nhóm thí nghiệm và đối chứng ở túi Fabricius và gan

Bảng 2. Biến đổi bệnh lý đại thể ở nhóm gà nhiễm CIAV

Biến đổi bệnh lý	Số con mổ khám	Số con có bệnh tích	Tỷ lệ (%)
Tủy xương nhạt màu	9	7	77,8
Tuyến ức teo	9	3	33,3
Tuyến ức xuất huyết	9	8	88,9
Gan có ánh vàng	9	7	77,8
Túi Fabricius teo	9	5	55,6
Túi Fabricius xuất huyết	9	0	0,0
Xuất huyết cơ	9	0	0,0

Kết quả tổng hợp (Bảng 2) cho thấy nhóm gà thí nghiệm xuất hiện bệnh tích điển hình của bệnh thiếu máu truyền nhiễm là hiện tượng tủy xương nhạt màu với tỷ lệ 77,8%, tiếp sau là teo túi Fabricius (55,6%) và teo tuyến ức (33,3%). Ngoài ra, các bệnh tích khác như gan nhạt màu và xuất huyết điểm ở tuyến ức cũng gặp với tỷ lệ cao, lần lượt là 77,8% và 88,9%. Cho đến nay, đã có nhiều công trình nghiên cứu về biến đổi bệnh lý đại thể của gà mắc bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở ngoài tự nhiên (Buscaglia & cs., 1994; Toro & cs., 1997; Ledesma & cs., 2001; Rimondi & cs., 2014) cũng như trong điều kiện thí nghiệm (Goodwin & cs., 1989; Bougiouklis & cs., 2007; Hegazy & cs., 2014; Simeonov & cs., 2014; Hussein & cs., 2016). Điểm chung của các nghiên cứu này là: ngoại trừ một số bệnh tích ít gặp như xuất huyết dưới da, xuất huyết cơ, biến đổi ở tuyến ức và tủy xương là phổ biến nhất. Dựa vào đặc điểm trên, kết quả nghiên cứu về biến đổi bệnh lý đại thể của nhóm gà nhiễm CIAV trong nghiên cứu này là phù hợp. Tuy nhiên, nghiên cứu này không phát hiện được bệnh tích xuất huyết ở một số cơ quan như dạ dày tuyến và cơ đùi, cơ lườn đã được mô tả khi gây bệnh thực nghiệm cho gà SPF 1 ngày tuổi (Yuasa & cs., 1979). Sự khác biệt về loại tổn thương cũng như mức độ nghiêm trọng của tổn thương đã được chứng minh phụ thuộc vào độc lực của chủng virus (Spackman & cs., 2002). Cũng cần chú ý, bệnh tích teo túi Fabricius hoặc teo tuyến ức có thể do nhiễm virus gây bệnh Gumboro hoặc virus Marek's thể tăng độc lực (vvIBDV, vv + MDV) (Calnek & cs., 1998; Stoute & cs., 2009). Do đó, chẩn đoán lâm sàng bệnh thiếu máu truyền nhiễm cần (i) phân biệt với các bệnh kể trên và (ii) dựa vào đặc điểm về lứa tuổi và bệnh tích ở tủy xương.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã gây nhiễm thành công CIAV cho gà 1 tuần tuổi với hiện tượng virus huyết bắt đầu xuất hiện tại thời điểm 3 tuần (20,0%), sau đó tăng dần, đạt 100% từ tuần thứ 6 sau gây nhiễm. Gà nhiễm CIAV trong điều kiện thí nghiệm ít có biểu hiện triệu chứng lâm sàng,

nhưng mức tăng khối lượng giảm rõ so với nhóm đối chứng bắt đầu từ tuần thứ 5 sau gây nhiễm virus. Bên cạnh đó, gà nhiễm CIAV có tỷ khối huyết cầu trung bình ở thời điểm 8 tuần sau nhiễm virus thấp hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng. Gà nhiễm CIAV có bệnh tích điển hình của bệnh thiếu máu truyền nhiễm, với đặc điểm teo các cơ quan lympho (tuyến ức 33,3%, túi Fabricius 55,6%) và tủy xương nhạt màu (77,8%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adair B.M. (2000). Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*. 24(2): 247-255.
- Allan G.M., Kennedy S., McNeilly F., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka S.J., Meehan B.M. & Adair B.M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121(1): 1-11.
- Aly M.M. (2001). Isolation of chicken infectious anemia virus from outbreaks in broilers chickens in Egypt. *J. Egypt. Vet. Med. Ass.* 61(6): 137-147.
- Bougiouklis P.A., Sofia M., Brellou G., Georgopoulou I., Billinis C. & Vlemmas I. (2007). A clinical case of chicken infectious anemia disease and virus DNA detection in naturally infected broilers in Greece. *Avian Dis.* 51(2): 639-642.
- Buscaglia C., Crosetti C.F. & Nervi P. (1994). Identification of chicken infectious anaemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina. *Avian Pathol.* 23(2): 297-304.
- Calnek B.W., Harris R.W., Buscaglia C., Schat K.A. & Lucio B. (1998). Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Dis.* 42(1): 124-132.
- Cardona C.J., Oswald W.B. & Schat K.A. (2000). Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *J Gen Virol.* 81(Pt. 8): 2067-2075.
- Đào Đoàn Trang, Cao Thị Bích Phượng, Vũ Thị Ngọc, Nguyễn Văn Giáp & Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2018). Sự lưu hành của virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà (CIAV) tại Hà Nội và vùng phụ cận. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 16(1): 36-45.
- Engström B.E., Fossum O. & Margaretha Luthman (1988). Blue wing disease of chickens: experimental infection with a Swedish isolate of chicken anaemia agent and an avian reovirus. *Avian Pathology.* 17(1): 33-50.

- Goodwin M.A., Brown J., Davis J.F., Girshick T., Miller S.L., Nordgren R.M. & Rodenberg J. (1992a). Comparisons of packed cell volumes (PCVs) from so-called chicken anemia agent (CAA; a virus)-free broilers to PCVs from CAA-free specific-pathogen-free leghorns. *Avian Dis.* 36(4): 1063-1066.
- Goodwin M.A., Brown J., Latimer K.S. & Miller S.L. (1991). Packed cell volume reference intervals to aid in the diagnosis of anemia and polycythemia in young leghorn chickens. *Avian Dis.* 35(4): 820-823.
- Goodwin M.A., Brown J., Miller S.L., Smeltzer M.A., Steffens W.L. & Waltman W.D. (1989). Infectious anemia caused by a parvovirus-like virus in Georgia broilers. *Avian Dis.* 33(3): 438-445.
- Goodwin M.A., Davis J.F. & Brown J. (1992b). Packed cell volume reference intervals to aid in the diagnosis of anemia and polycythemia in young broiler chickens. *Avian Dis.* 36(2): 440-443.
- Goryo M., Suwa T., Umemura T., Itakura C. & Yamashiro S. (1989). Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol.* 18(1): 73-89.
- Hegazy A.M., Abdallah F.M., Abd-el Samie L.K. & Nazim A.A. (2014). Incidence of chicken anemia virus in Sharkia governorate chicken flocks. *Assiut Vet. Med. J.* 60(142): 75-82.
- Hussein E., Arafa A.E., Anwar N. & Khafaga A. (2016). Molecular and pathological analysis of chicken anemia virus isolated from field infection in three Egyptian provinces. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 4(5): 218-229.
- Huynh L.T.M., Nguyen G.V. Do L.D., Dao T.D., Le T.V., Vu N.T. & Cao P.T.B. (2019). Chicken infectious anemia virus infections in chickens in northern Vietnam: epidemiological features and genetic characterization of the causative agent. *Avian Pathol.* DOI:10.1080/03079457.03072019.01637821.
- Kaffashi A., Noormohammadi A.H., Allott M.L. & Browning G.F. (2006). Viral load in 1-day-old and 6-week-old chickens infected with chicken anaemia virus by the intraocular route. *Avian Pathol.* 35(6): 471-474.
- Kye S. J., Kim J.Y., Seul H.J., Kim S., Kim S.E., Lee H.S., Sorn S. & Choi K.S. (2013). Phylogenetic analysis and genetic characterization of chicken anemia virus isolates from Cambodia. *Poult Sci.* 92(10): 2681-2686.
- Ledesma N., Fehervari A.T., Casaubon M.T., Lucio E. & Ratz F. (2001). Chicken infectious anemia in Mexico: virus identification and serology survey. *Avian Dis.* 45(4): 788-796.
- McNeilly F., Smyth J.A., Adair B.M. & McNulty M.S. (1995). Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.* 39(3): 532-537.
- McNulty M.S. (1991). Chicken anaemia agent: A review. *Avian Pathology.* 20(2): 187-203.
- Miles A.M., Reddy S.M. & Morgan R.W. (2001). Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Dis.* 45(1): 9-18.
- Olszewska-Tomczyk M., Swieton E., Minta Z. & Smietanka K. (2016). Occurrence and Phylogenetic Studies of Chicken Anemia Virus from Polish Broiler Flocks. *Avian Dis.* 60(1): 70-74.
- Rimondi A., Pinto S., Olivera V., Dibarbora M., Perez-Filgueira M., Craig M.I. & Pereda A. (2014). Comparative histopathological and immunological study of two field strains of chicken anemia virus. *Veterinary research.* 45(1): 102-112.
- Rozypal T.L., Skeeles J.K., Dash J.K., Anderson E.J. & Beasley J.N. (1997). Identification and partial characterization of Arkansas isolates of chicken anemia virus. *Avian Dis.* 41(3): 610-616.
- Simeonov K.B., Petrova R.T., Gyurov B.I., Peshev R.D. & Mitov B.K. (2014). Isolation and PCR identification of chicken anaemia virus infection in Bulgaria. *Bulg. J. Vet. Med.* 17(4): 276-284
- Spackman E., Cloud S.S., Pope C.R. & Rosenberger J.K. (2002). Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate I. *Pathogenesis.* *Avian Dis.* 46(4): 945-955.
- Stoute S.T., Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E., Cooper G.L., Anderson M.L., Woolcock P.R., Bickford A.A., Senties-Cue C.G. & Charlton B.R. (2009). The diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California pullets. *Avian Dis.* 53(2): 321-326.
- Subler K.A., Mickael C.S. & Jackwood D.J. (2006). Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression exacerbates *Campylobacter jejuni* colonization and shedding in chickens. *Avian Dis.* 50(2): 179-184.
- Sun S., Cui Z., Wang J. & Wang Z. (2009). Protective efficacy of vaccination against highly pathogenic avian influenza is dramatically suppressed by early infection of chickens with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathology.* 38(1): 31-34.
- Tan J. & Tannock G.A. (2005). Role of viral load in the pathogenesis of chicken anemia virus. *J Gen Virol.* 86(Pt 5): 1327-1333.
- Tarek K., Mohamed M., Omar B. & Hassina B. (2012). Morpho-histological study of the thymus of broiler chickens during post-hatching age. *International Journal of Poultry Science.* 11(1): 78-80.

- Tongkamsai S., Lee M.S., Cheng M.C., Chaung H.C., Tsai Y.L. & Lien Y.Y. (2019). Persistent infection with chicken anemia virus in 3-week-old chickens induced by inoculation of the virus by the natural route. *Pathogens*. 8 (2): 48-55.
- Toro H., Ramirez A.M. & Larenas J. (1997). Pathogenicity of chicken anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens. *Avian Pathol.* 26(3): 485-499.
- Trinh D.Q., Ogawa H., Bui V.N., Nguyen T.T., Gronsang D., Baatartsogt T., Kizito M.K., AboElkhair M., Yamaguchi S., Nguyen V.K. & Imai K. (2015). Development of a blocking latex agglutination test for the detection of antibodies to chicken anemia virus. *Journal of virological methods*. 221: 74-80.
- Vagnozzi A.E., Espinosa R., Cheng S., Brinson D., O'Kane P., Wilson J. & Zavala G. (2018). Study of dynamic of chicken infectious anaemia virus infection: which sample is more reliable for viral detection? *Avian Pathol.* 47(5): 489-496.
- Van Dong H., Tran G.T.H., Van Nguyen G., Dao T.D., Bui V.N., Huynh L.T.M., Takeda Y., Ogawa H. & Imai K. (2019). Chicken anemia virus in northern Vietnam: molecular characterization reveals multiple genotypes and evidence of recombination. *Virus Genes*. DOI: 10.1007/s11262-11019-01686-11268.
- Van Santen V.L., Joiner K.S., Murray C., Petrenko N., Hoerr F.J. & Toro H. (2004). Pathogenesis of chicken anemia virus: comparison of the oral and the intramuscular routes of infection. *Avian Dis.* 48(3): 494-504.
- Van Santen V.L., Li L., Hoerr F.J. & Lauerman L.H. (2001). Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama. *Avian Dis.* 45(2): 373-388.
- Wani M.Y., Dhama K., Tiwari R., Barathidasan R., Malik Y.S., Singh S.D. & Singh R.K. (2015). Immunosuppressive effects of chicken infectious anaemia virus on T lymphocyte populations using flow cytometry and hematological parameters during experimental subclinical infection in chicks. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(3): 143-150.
- Wani M.Y., Dhama K., Latheef S.K., Singh S.D. & Tiwari R. (2014). Correlation between cytokine profile, antibody titre and viral load during sub-clinical chicken anaemia virus infection. *Veterinari Medicina*. 59(1): 33-43.
- Yang J.S., Song D.S., Kim S.Y., Lyoo K.S. & Park B.K. (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 15(4): 369-373.
- Yuasa N., Taniguchi T., Goda M., Shibatani M., Imada T. & Hihara H. (1983). Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*. 23(3): 75-77.
- Yuasa N., Taniguchi T., Noguchi T. & Yoshida I. (1980). Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anemia by chicken anemia agent. *Avian diseases*. pp. 202-209.
- Yuasa N., Taniguchi T. & Yoshida I. (1979). Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian diseases*. pp. 366-385.
- Zhou W., Shen B., Yang B., Han S., Wei L., Xiao B. & Zhou J. (1997). Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in China. *Avian Dis.* 41(2): 361-364.