

鸡传染性贫血病毒研究进展

卢春 陈溥言 蔡宝祥

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

5852.65

Advances of Research on Chicken Anaemia Virus

Lu Chun Chen Puyan Cai Baoxiang

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

关键词 鸡传染性贫血病毒, 分子生物学, 脱噬素

Key words Chicken anaemia virus, Molecular biology, Apoptin

鸡传染性贫血病毒

鸡传染性贫血病是由鸡传染性贫血病毒(Chicken anaemia virus, CAV; 原称鸡传染性贫血因子: Chicken anaemia agent, CAA)引起的再生障碍性贫血和全身淋巴组织萎缩性免疫缺陷病。自 Yuasa 等^[1]首次报道并分离了该病毒后, 世界许多国家包括中国^[2,3]都相继证明了该病的发生。鉴于此病的垂直和水平传播引起的临床和亚临床感染所造成的较大经济损失, 故该病目前已被纳入世界范围内重要禽病研究的行列。

近年来, 随着单克隆抗体(McAb)、核酸探针、聚合酶链反应(PCR)、基因重组及核酸序列分析等新技术的不断采用, 极大地推动了 CAV 分子生物学的研究, 尤其在病毒的核酸类型、基因组结构及其转录特征、特异性编码蛋白及其功能、病毒致病机理、疾病诊断和基因工程亚单位疫苗研制等方面取得了长足进展, 本文将就此作一概述。

1 病毒及其基因组

CAV 为一 23~25 nm 大小, 无囊膜的正二十面体病毒, 浮密度 1.33~1.34 g/mL^[4,5]。理化特征上表现为: 对丙酮、氯仿、乙醚均不敏感, 可耐受 pH 3.0, 80 °C 30 min 部分失活, 100 °C 10 min 完全失活。对 S1 核酸酶敏感^[6-8]。

电镜检查及 Southern blot 杂交显示, CAV 的核酸型为单链负股环状 DNA, 外为唯一的、且为负股反意链所编码的 50 kDa 的衣壳蛋白(又称结构蛋白)^[4,5,9,10]。

在感染病毒后发病的鸡体内, CAV 的 DNA 主要以单链环状形式广泛存在一些内脏器官中, 其中胸腺、脾脏中的含量较高, 相比之下, 肝脏、法氏囊等组织含量稍低。体外细胞培养方面的研究资料表明, 在病毒感染的细胞中, 单链环状和双链复制型 DNA 含量各占一半, 而后者主要参与 RNA 转录和单股环状 CAV 基因组的产生(图 1)^[11]。最近, Noteborn 等^[12]进一步用细胞培养实验研究认为, 病毒 DNA 以三种主要复制形式存在于感染细胞中: 双链开环、线形闭环和单链环状, 其复制方式完全类似于单链环状 DNA 噬菌体 phix174(Φ174)的所谓

• 本文于 1995 年 11 月 1 日收到, 1996 年 1 月 29 日修回

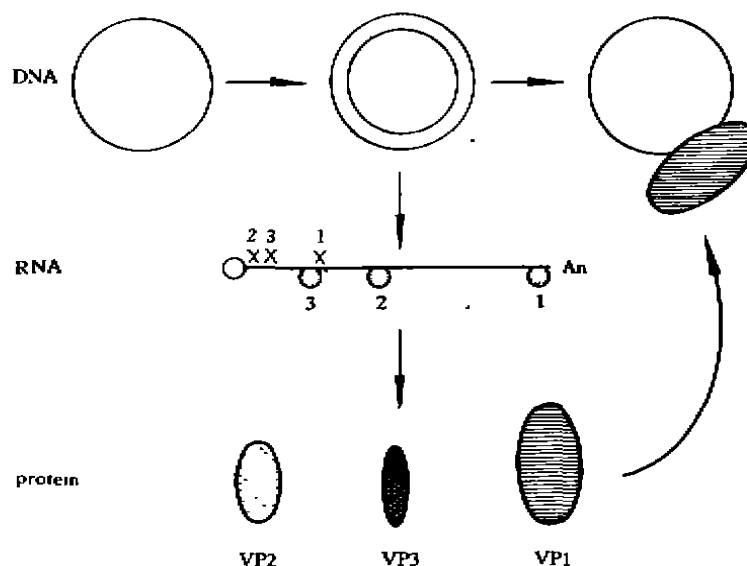


图1 CAV分子加工模式图^[41]

病毒衣壳中的单股环状DNA分子在感染细胞中演变为复制型双股环状DNA，由此生成的含poly(A)尾多顺反子mRNA，内含三个部分重叠的开读框，每个框架都有自身的起始和终止密码子(用×和●示出)；在感染细胞中同时合成三种CAV编码的蛋白VP₁、VP₂和VP₃(脱噬素)，其中VP₁可能为衣壳蛋白。

Figure 1 Schematic representation of the molecular processes of CAV^[41]

A single-stranded circular DNA is present in the virus capsids (single circle). In infected cells, this ss-DNA genome becomes a ds circular replicative intermediate (double circle), from which 1 polyadenylated RNA species is transcribed (line). This polycistronic RNA contains three partially overlapping genes each with its own initiation (×) and termination (●) codons. Three CAV-encoded proteins VP₁, VP₂ and VP₃(apoptin) are synthesized in CAV-infected cells. VP₁ is probably the capsid protein.

“滚环复制模式”(Rolling-circle model)^[13]。

CAV代表株CAV-CUX-1^[14]的基因组克隆和测序工作已结束，其中克隆化的DNA代表了整个CAV双股基因组(dsDNA)，全长有2319个核苷酸(nt)，内含病毒复制及致病时所需的全部元件^[9]。限制性内切酶酶切图谱显示BamHI、EcoRI、XbaI和SstI在CAV dsDNA上各含一个酶切位点。核酸序列分析结果表明，位于CAV基因组的正股链上含有三个部分或完全重叠的开读框架(ORF)，其基因编码序列与基因数据库中已知序列间没有显著的同源性^[9]。来自美国、日本、澳大利亚、以色列等国的核苷酸序列分析结果显示，CAV不同毒株间序列差异极小，这点更证实了McNulty的“现有CAV毒株都属于同一种血清型”的论断^[15,16]。

至于CAV的分类地位目前已经有了正式定论。与此类似的另外两种动物病毒——猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)^[17]和鸚鵡喙羽病病毒(Psittacine beak-and-feather-disease virus, PBFDV)^[18]，1995年国际病毒分类委员会已将三者归为一类，成立了一新的病毒科，定名为圆

环病毒科(Circoviridae)^[19]。虽说后两者亦为无囊膜的,二十面体对称的单股环状DNA病毒,但是从本质上看三者间的相似点较少,首先它们间根本不存在同源的DNA序列和共同的抗原决定簇^[20],另外PCV、PBFDV的病毒粒子远远小于CAV,同时也不具备CAV的表面结构,更何况CAV基因组转录产物仅为一个非拼接性多顺反子mRNA,而PCV至少有三个mRNA^[10,21,22]。

2 CAV基因组转录

CAV基因组转录的早先研究是建立在CAV感染的MDCC-MSB₁(马立克氏病病毒转化的淋巴肿瘤细胞系)基础之上,其转录的主要产物为一长约2.1 kb含poly(A)尾的mRNA^[2]。Phenix等^[10]用Dot blot杂交发现,病毒感染细胞8 h后,细胞中的RNA含量较低,而感染32 h后,RNA量明显地上升。S₁核酸酶图谱、引物延伸试验、转录主要产物3'-端基因放大、克隆和序列测定的结果表明,CAV转录起始位点是唯一的,同时仅含一个转录终止点。以上结果还揭示,转录起始位点位于TATA-框(324 nt)下游的第30 nt处,也就是第一个ORF(380 nt)的起始密码子上游的第26 nt处。poly(A)位点位于距唯一完整poly(A)信号(AAUAAA, 2317 nt)25 nt处。Phenix等^[10]利用一系列基因探针进行的Northern blot分析证明,2.1 kb的转录产物为一非拼接的多顺反子mRNA,且能编码病毒的三个特异性蛋白VP₁, VP₂和VP₃,此结果提示,除5'-近端有一起始密码子外,mRNA的内部仍含二个AUG起始密码子,故推断核糖体在扫描mRNA时,将有选择性地对第一、第二或第三个起始密码子进行起始翻译。

对CAV-CUA-1基因组全序列分析结果表明^[9],CAV的帽子位点(Cap site)即转录起始位点定位于352~356 nt处,其上游有一套完整的CAV启动-增强子结构(150 nt~350 nt)。位于324 nt处的TATA-框又称Hogness框,其结构和功能大致类似于大肠杆菌和大宝杆菌噬菌体启动子中的Pribnow框,在RNA转录时期,CAV的TATA-框被认为是RNA聚合酶II转录时的结合位点。溯流而上,分别是SP₁5'-GGGCGG-3'(305~310 nt)和CCAAT-TF(260~266 nt)结合点。更远上游有4或5个拷贝(依不同毒株而定)的近21 bp完整的正向重复序列定位着,其中间被一12 bp的插入子所隔开。试验证明,上述这一非转录结构区域具有启动子活性,正如Phenix和Noteborn等^[10,23]通过瞬时基因表达法所证明,该区域能刺激人的生长激素基因和乙酰氯霉素转移酶报告基因的高效表达。进一步的研究证明了该重复序列为主要转录激活元件,具备增强子的性质。事实上无论是单一正向重复序列单元或是12 bp插入子虽能增强转录活性,但其增强的效率较低。诸多研究^[12,23~26]表明,含有串联重复序列和12 bp插入子是现有CAV毒株的共性,而更多的是4个拷贝的重复序列。

总之,启动子的活性与非转录区具有密切关系的特征是CAV基因组的一重要性质,也是与别的动物病毒相区分的一个显著标志。

3 CAV编码蛋白

在感染细胞中,CAV的三个ORF分别编码VP₁(51.6 kDa),VP₂(24.0 kDa)和VP₃(13.6 kDa)(图1)。

Todd等^[5]在研究VP₁结构时发现,VP₁的N端含有一个氨基酸拖迹——组蛋白的前体,而组蛋白主要由精氨酸组成,精氨酸能够和DNA链牢固地结合在一起,起保护DNA的功效。故VP₁的N端区域可以结合在病毒衣壳内的ssDNA上。据推测VP₁基因所编码的51.6 kDa的蛋白质很可能是衣壳蛋白。

近来,CAV 株 McAb 的研制和重组杆状病毒表达载体的构建,都加速了对其三种编码蛋白性质的研究。Vlak 等^[27]通过对重组杆状病毒表达系统所产生的 VP₁,VP₂ 和 VP₃ 抗原性分析得出这样的结论:至少 VP₁ 和 VP₂ 两种重组体同时感染昆虫细胞,其表达产物才具有中和抗原特性,而两种或三种单独的表达产物简单的混合不能刺激机体产生中和抗体。可以推断,VP₂ 属非结构蛋白,可能是一种辅助性蛋白,在病毒感染过程中的某一时期大量出现,辅助病毒装配为成熟粒子后逐渐消失。

VP₃ 为所编码的蛋白质是一种脱噬素(Apoptin)^[28],该物质是由 121 个氨基酸组成的含两个脯氨酸富集臂和两个阳离子结合位点的小蛋白质。

4 CAV 致病机理

CAV 感染后,机体会出现两种主要临床症状,一是贫血,二是免疫缺陷。导致上述症状的原因是 CAV 破坏了骨髓中的成红细胞和胸腺皮质细胞(以 T 细胞为主),细胞受损特征在亚显微结构上表现为染色体高度浓缩,大量断裂后的 DNA 片段充实于核质中,核膜周围有高度密集的电子云小体,细胞的形态和结构完全改变,形成了病理上所谓的“脱噬现象”。

CAV 如何引起脱噬现象?目前存在着两种解释。第一种观点认为,脱噬现象是 CAV 感染后的副作用,非它直接所致。Cohen 等^[39]研究认为,CAV 感染可使机体产生糖皮质激素和别的一些非病毒性激素。试验表明,这些激素能刺激以胸腺为主的淋巴组织中的 T 细胞,使其形态、结构和功能发生严重衰变,同时骨髓中成红细胞的衰变是因缺少来自胸腺产生的调控信号所致。以 Noteborn 等^[28]为代表的第二种观点支持者认为,CAV 对胸腺和骨髓具有高度特异性,一旦病毒入侵至这些组织 T 淋巴细胞和成红细胞时,其 VP₃ 编码基因开始表达,产物为脱噬素。免疫金电镜技术研究表明,脱噬素的 C'-端基序臂能够和 T 细胞染色体结构中的组氨酸或非组氨酸发生作用,造成超螺旋的 DNA 断裂而导致大量 DNA 片段出现,使胸腺皮质细胞和骨髓的成红细胞发生衰变,从而造成机体免疫机能丧失伴有严重的贫血症状出现。事实上目前对 CAV 诱导脱噬作用的方式仍有争论,故其致病机理有待深入研究。

5 诊断该病的新技术

运用特异、敏感方法对 CAV 感染快速作出诊断是控制此病流行发生的一项重要措施。

最初此病的诊断是建立在病毒分离和鉴定基础之上的。1104-X-5(禽白血病病毒所诱导的 B 淋巴细胞系)和 MDCC-MSB1 被视为对 CAV 较敏感、又理想的宿主细胞,遗憾的是该法既费钱又费时。

随着分子生物学新方法的不断涌现,PCR 技术、核酸探针技术以及第二代 ELISA 技术等已用于 CAV 特异性检测。

Noteborn 等^[9]采用同位素标记克隆化的 CAV 基因组作探针进行杂交试验,能检测出不同毒株感染的细胞中双链复制型及单链环状 CAV 基因组。类似地,Todd 等^[29]用³²P 标记的克隆化 CAV DNA 片段作探针,可检测到 CAV 感染鸡组织中特异性 DNA。随后 Noteborn 等^[30]用非放射性的地高辛(digoxigenin)标记探针,成功地检测了迄今为止全部的 CAV 分离株。最近 Nielsen 等^[38]用生物素标记的双股 DNA 探针进行原位杂交试验,不仅可以检测到人工感染发病鸡体内的 CAV,而且还可检测患兰翅病病鸡体内所含的 CAV DNA。

为顺应检测敏感性的需要,CAV 特异性 PCR 技术在实验室诊断及疫苗试验上,充分体现了该法不可比拟的优势,它不仅与病毒分离法一样敏感,而且能检测到高背景 DNA 下的 CAV

分子。Soine 等^[31]利用套式 PCR 法(多组 oligo 引物)扩增出能和特异性探针发生杂交的 CAV 基因,可惜此法易造成假阳性结果。CAV 感染剂量大小将直接影响其致病程度,故检出感染细胞或组织中的病毒含量尤为重要。Dren 等^[32]采用的热启动 PCR 法^[33]不仅克服了上述缺陷,而且还成功地检测到一个感染细胞,相当于 10 TCID₅₀中的 CAV 分子。

随着基因重组技术的日臻完善,第二代 ELISA 检测抗体法也相应诞生了。Pallister 等^[40]将澳大利亚的一 CAV 分离株的 VP₁ 基因(其序列与别的毒株差异极小)克隆进原核表达载体中,表达产物经纯化后用作 ELISA 的包被材料,检测 CAV 感染鸡血清中的抗体,证明既特异又敏感,从而为 CAV 感染开辟了一条新的诊断途径。

6 CAV 重组亚单位疫苗

目前,预防该病的疫苗为非致弱的 CAV 活苗,病毒经鸡胚增殖后,免疫成年蛋鸡,产生的保护性中和抗体经卵黄囊传至雏鸡,从而使雏鸡达到被动免疫的效果。虽说该法目前在世界范围内被普遍采用,但是使用活的非致弱的病毒疫苗总存在一定危险。正如 McConnell 等^[34,35]试验显示,3 周龄含母源抗体的小鸡感染 CAV 后,即使无明显临床症状,其免疫系统的功能也将显著降低,仍可导致亚临床感染的出现。事实上目前的非致弱病毒活疫苗研制及使用还存在以下几点缺陷:①非致病性的 CAV 株至今未分离到;②获得能于鸡胚或细胞上增殖的高滴度的病毒较为困难;③失活的 CAV 用作疫苗,其免疫效果较差;④唯一已知对 CAV 敏感的 MDCC-MSB1 细胞系对马立克氏病病毒和禽白血病病毒也同样敏感。故人们试图通过基因工程的方法去寻找一种重组亚单位疫苗。业已证明的 VP₁、VP₂ 基因所编码的蛋白具有中和抗原特性,它们的重组杆状病毒载体表达产物免疫成年蛋鸡,使下一代雏鸡都获得保护性抗体。另外已知的杆状病毒为昆虫的一种特异性病毒,对鸡属非致病性的,故安全性可以保障。

虽说活病毒疫苗能产生较好的免疫保护性,成本比基因工程疫苗低。但目前认为,对 CAV 重组亚单位疫苗的研究有助于别的重组病毒表达载体的构建,如禽的疱疹病毒,禽痘病毒等,这些病毒载体在机体内表达 CAV VP₁ 和 VP₂ 的同时,其本身编码蛋白质基因也相应得到表达。

7 结语

CAV 是一特殊的病毒,该病毒具备的一些性质是常见的一些动物病毒所没有的。CAV 基因组含三个 ORF,它们在感染细胞中同时被转录、表达,调控方面的原理仍部分未搞清,其病毒复制机制有待进一步研究。另外,CAV 产生的脱噬素通过脱噬作用不仅能引起鸡成淋巴细胞、成红细胞的衰变,而且对人的白血病和淋巴瘤细胞也有同样的作用,其应用主要表现在人类医学的恶性肿瘤治疗上^[36,37]。世界范围内的 CAV 毒株基因组是高度一致的,尤其表现在其编码区和调控元件上,建立于已知克隆化的 DNA 基础上的诊断方法和不同类型疫苗的研制方法也是通用的。预计未来的 CAV 研究有可能朝这些方向发展:①更详尽的 CAV 转录和调控机制;②CAV 致病机理;③CAV 脱噬作用的疾病治疗模式;④高效、廉价的 CAV 重组基因疫苗的研制。

致谢 本文承蒙陆承平教授提供部分资料,张训海、简中友、胡青海和兰邹然等同学参与文献查阅,在此深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks. *Avian Diseases*, 1979, 23:366-385
- 2 崔现兰, 李桂香, 吴东来等. 鸡传染性贫血病毒病的鉴定. *中国畜禽传染病*, 1992, 6:3-5
- 3 李孝欣, 徐为燕, 唐桂运等. 鸡传染性贫血病毒的分离鉴定. *中国兽医杂志*, 1993, 19(11):3-5
- 4 Gelderblom H, King S, Lurz R *et al.* Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). *Arch Virol*, 1989, 109:115-120
- 5 Todd D, Creelan J L, Mackie D P *et al.* Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol*, 1990, 71:819-823
- 6 Goryo M, Sugimura H, Matsumoto S *et al.* Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Avian Pathol*, 1985, 14:483-496
- 7 Taylor S P. The effect of acetol on the viability of chicken anaemia agent. *Avian Diseases*, 1992, 36:753-754
- 8 Urlings H A P, De Boer G F, Van Roozelaar D J *et al.* Inactivation of chicken anaemia virus in chickens by heating and fermentation. *Veterinary Quarterly*, 1993, 15:85-88
- 9 Noteborn M H M, De Boer G F, Van Roozelaar D J *et al.* Characterization of cloned chicken anaemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol*, 1991;65:3131-3139
- 10 Dhenix K V, Meehan, B M, Todd D *et al.* Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. *J Gen Virol*, 1994, 75:905-909
- 11 Noteborn M H M, Veldkamp S, Verschuereen C A J *et al.* Molecular - biological characterization of chicken anaemia virus. In: M S, McNulty and J B Mc Ferran eds, *Virus Disease of Poultry - New and Evolving Pathogens*, 1994, pp. 195-213, Brussels, European Commission, VI/4104/94 - EN
- 12 Meehan B M, Todd D, Creelan J L *et al.* Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent; sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch Virol*, 1992, 124:301-319
- 13 Kornberg A. *DNA replication*. 1980, Suppl. 1982, Freeman, San Francisco, USA.
- 14 Bulow V Von, Fuchs B, Vielitz E *et al.* Fruehsterblichkeitsyndrom bei kuken nach Doppelinfektion mit dem virus des Marekschen Krankheit (MDV) und einem Anemie - Erreger(CAA). *J Vet Medic*, 1983, B, 32:679-693
- 15 McNulty M S, Connor T J, Mcneilly F *et al.* Chicken anaemia agent in the United States; isolation of the virus and detection of antibody in the broiler breeder flocks. *Avian Diseases*, 1989, 33:691-694
- 16 McNulty M S, Connor, T J, McNeilly F *et al.* Preliminary characterization of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom. *Avian Pathol*, 1990, 19:67-73
- 17 Tischer I, Gelderblom H, Vetterman W *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, 295:64-66
- 18 Ritchie B W, Niagro F D, Lukert P D *et al.* Characterization of a new virus derived from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virol*, 1989, 33:707-713
- 19 陆承平. 最新脊椎动物病毒分类简介. *江苏微生物快讯(增刊)*, 1995.
- 20 Todd D, Niagro F D, Ritchie B W *et al.* Comparison of three animal viruses with circular single - stranded DNA genomes. *Arch Virol*, 1991, 117:129-135
- 21 Noteborn M H M, Verschuereen C A J, Roozelaar Van Der Eb A J *et al.* Detection of chicken anaemia virus DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 1992, 21:107-118
- 22 Mankertz J, Bulh, H - J. Transcriptional analysis of porcine circovirus (PCV). Abstracts of the VIIIth International Congress of Virology, Berlin, Germany, 1990; p. 54-008, p. 380
- 23 Noteborn M H M, Zantema A, Verschuereen C A J *et al.* Identification of the promoter region of chicken anaemia virus(CAV) containing a novel enhancer element. *Gene*, 1994, 150:313-318
- 24 Claessens J A J, Schrier C C, Mockett A P A *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia

- virus. *J Gen Virol*, 1991, 72:2003~2006
- 25 Kato A, Fujino M, Nakamura T *et al*. Gene organization of chicken anaemia virus (CAV), 1994, Assessment No. D31965
 - 26 Soine C, Renshaw R, Oconnell P H *et al*. Sequence analysis of cell culture - and non-cell culture - adaptable strains of chicken infectious anaemia virus. 1994, Personal communication
 - 27 Vlak J M, Keus R J A. Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines, In: *Viral Vaccines*. Mizrahi A ed. New York, Wiley - Liss Inc. 1990. 93~123
 - 28 Noteborn M H M, Todd D, Verschuere C A J *et al*. A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, 1994, 68:346~351
 - 29 Todd D, Mawhinney K A, McNulty M S. Detection and differentiation of chicken anaemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:1661~1666
 - 30 Noteborn M H M, Verschuere C A J, Roozelaar van Der Eb A J *et al*. Detection of chicken anaemia virus DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 1992, 21:107~118
 - 31 Soine C, Watson S K, Rybicki E *et al*. Determination of detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anaemia virus. *Avian Diseases*, 1993, 37:467~476
 - 32 Dren, Cs N, Koch G, Kant A *et al*. A hot - start PCR for the laboratory diagnosis of CAV. *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia*, Ranischholzhausen, Germany, 1994, 413~420
 - 33 Chou Q, Russell M, Birch D E *et al*. Prevention of pre - PCR mispriming and primer dimerization improves low - copy - number amplification. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:1717~1723
 - 34 McConnell C D G, Adair B M, Munulty M S. Effects of chickens on macrophage function in chickens. *Avian Disease*, 1993, 37:358~365
 - 35 McConnell C D G, Adair B M, Munulty M S. Effects of chicken anaemia virus on cell - mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Disease*, 1993, 37:366~374
 - 36 Zhuang S - M, Landegent J E, Verschuere C A J *et al*. Apoptin, a protein encoded by chicken anaemia virus, induces cell death in various hematologic malignant cell *in vivo*. *Leukemia*, 1994.
 - 37 Zhuang S - M, Shvarts A, Van Ormondt H *et al*. Apoptin, a protein encoded by chicken anaemia virus, induces p53 - independent apoptosis in human osteosarcoma cell. *Cancer Research*, 1994.
 - 38 Nielsen O L, Jrgensen P H, Bisgaard M *et al*. In situ hybridization for the detection of chicken anaemia virus in experimentally - induced infection and field outbreaks. *Avian Pathol*, 1995, 24:149~155
 - 39 Cohen J J. Programmed cell death in the immune system. *Advances in Immunol*, 1992, 50:55~85
 - 40 Pallister J, Fahy K J, Sheppard M. Cloning and sequencing of the chicken anaemia virus (CAV) ORF - 3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV. *Vet Microbiol*, 1994, 39:167~178
 - 41 Noteborn M H M, Koch G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol*, 1995, 24:11~31