

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 48, No 1 (1997)



Antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in poultry reared in our country

J. GEORGOPOULOU (Ι. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ), P. IORDANIDIS (Π. ΙΟΡΔΑΝΙΔΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15792](https://doi.org/10.12681/jhvms.15792)

Copyright © 2018, J GEORGOPOULOU, P IORDANIDIS



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

GEORGOPOULOU (Ι. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ) J., & IORDANIDIS (Π. ΙΟΡΔΑΝΙΔΗΣ) P. (2018). Antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in poultry reared in our country. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 48(1), 37–41. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15792>

Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων (CAV) σε πτηνά εκτρεφόμενα στη χώρα μας.

Ι. Γεωργοπούλου¹, Π. Ιορδανίδης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Με τη μέθοδο της ELISA εξετάστηκαν, για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του ιού της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων (CAV), 258 δείγματα ορών που προέρχονταν από 39 εκτροφές ορνιθίων. Ειδικότερα οι 104 οροί προέρχονταν από 11 εκτροφές πατρογονικών σμηνών κρεοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας 1 ημέρας έως 9,5 μηνών, οι 147 από 26 εκτροφές κρεοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας 1 ημέρας μέχρι 45 ημερών και οι 7 από 2 εκτροφές ωοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας 4 και 15 ημερών. Αντισώματα βρέθηκαν στους ορούς 5 πατρογονικών σμηνών ηλικίας 70 ημερών, 2,5, 5,5, 6 και 9,5 μηνών αντίστοιχα και σε 15 σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων από τα οποία δύο είχαν νεοσσούς ηλικίας 1 ημέρας και τα υπόλοιπα 13 σμήνη ορνίθια ηλικίας 8, 15, 16, 28, 38, 42, 43 και 45 ημερών αντίστοιχα. Η ανεύρεση των θετικών ορών ενισχύει τις κλινικές μας παρατηρήσεις σχετικά με την παρουσία της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων στις εκτροφές των κρεοπαραγωγών κυρίως ορνιθίων στη χώρα μας.

ABSTRACT. Georgopoulou J¹, Iordanidis P¹. Antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in poultry reared in our country. *Bulletin of Hellenic Veterinary Medical Society* 48(1):37-41. Two hundred fifty eight serum samples collected from 39 poultry flocks were tested for detecting antibodies to chicken anaemia virus (CAV) by ELISA method. One hundred four blood serums were collected from 11 broiler breeder flocks aged 1 day to 9,5 months, 147 from 26 broiler breeder flocks aged 1 to 45 days and 7 from 2 commercial layer flocks aged 4 in 15 days. Antibody to CAV were detected in five broiler breeder flocks aged 70 days, 2,5, 5,5, 6 and 9,5 months respectively and in 15 broiler flocks from which 2 of them aged 1 day and the other 13 flocks aged 8, 15, 16, 28, 38, 42, 43 and 45 days respectively. The detection of positive serums supports our clinical observations about the presence of chicken anaemia infection principally in broiler flocks in our country.

¹Κλινική Παθολογίας των πτηνών, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ.

¹Clinic of Poultry Diseases, Veterinary Faculty, Aristotelian University of Thessaloniki

Ημερομηνία υποβολής: 25.4.94

Ημερομηνία εγκρίσεως: 31.3.97

Λέξεις ευρετηριασμού: Λοιμώδης αναιμία ορνιθίων, αντισώματα, ELISA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων, γνωστός ως CAA (chicken anaemia agent) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Yuasa και συν.¹ το 1979. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα ο ιός αυτός είναι circovirus και αναφέρεται πλέον ως CAV (chicken anaemia virus).

Ο ιός έχει παγκόσμια διασπορά^{1,2,3,4,5,6,7,8,9} και ο μόνος γνωστός ξενιστής φαίνεται να είναι τα ορνίθια. Τα πτηνά είναι δυνατόν να μολυνθούν σε κάθε ηλικία, η ευαισθησία τους όμως για να εκδηλώσουν τη νόσο μειώνεται σημαντικά από την ηλικία των 2-3 εβδομάδων της ζωής τους¹⁰. Η ανάπτυξη της ανοχής των πτηνών έναντι του ιού με την πάροδο της ηλικίας καθυστερεί σημαντικά και η νοσηρότητα και θνησιμότητα αυξάνεται, όταν τα ορνίθια μολυνθούν ταυτόχρονα με CAV και τον ιό της νόσου του Marek ή τον ιό της νόσου του Gumboro^{11,12,13,14}.

Ο CAV μεταδίδεται κάθετα¹⁵ και οριζόντια^{1,16,17}. Η κάθετη μετάδοση γίνεται από τα σμήνη γεννητόρων που μολύνονται για πρώτη φορά μετά την έναρξη της ωοπαραγωγής. Στην περίπτωση αυτή οι γεννήτορες δεν παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, οι απόγονοί τους όμως ασθενούν στην ηλικία των 2-3 εβδομάδων της ζωής τους^{2,18,19}. Τα προσβλημένα πτηνά εμφανίζουν έντονη αναιμία, ατροφία του θύμου αδένος, απλασία του μυελού των οστών, χαμηλό αιματοκρίτη και απώλεια βάρους. Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η ανοσοκαταστολή με αποτέλεσμα την εμφάνιση επιπλοκών, όπως γαγγραινώδης δερματίτιδα²⁰, την αποτυχία του εμβολιασμού έναντι της νόσου του Marek²¹, τις αυξημένες απώλειες με τη νόσο του Gumboro¹⁷, καθώς και την μειωμένη απόδοση του σμήνους.

Η οριζόντια μετάδοση συμβαίνει κατά την επαφή των υγιών νεοσσών με νεοσσούς μολυσμένους με την κάθετη οδό. Η οριζόντια μετάδοση καταλήγει συνήθως σε υποκλινικές μορφές της νόσου.

Η κλινική διάγνωση μπορεί να βασιστεί στα συμπτώματα και στις μακροσκοπικές αλλοιώσεις, ενώ η εργαστηριακή επιβεβαίωση πραγματοποιείται με την απομόνωση του ιού²². Τέλος τα αντισώματα μπορεί να ανιχνευθούν με τη δοκιμή της οροεξουδετέρωσης, με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό²² και με την έμμεση ELISA²³.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρήσαμε ορισμένα ύποπτα περιστατικά της λοιμώδους αναιμίας σε κρεοπαράγωγα ορνίθια, που προσκομίστηκαν για εξέταση στην κλινική μας. Το γεγονός αυτό ήταν και η αφορμή της παρούσης εργασίας, όπου με την εφαρμογή της έμμεσης ELISA έγινε ανίχνευση αντισωμάτων σε διάφορα σμήνη και αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Οροί ορνιθίων (δείγματα ορών)

Οι οροί που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν περιοδικά από 39 εκτροφές από διάφορες περιοχές της χώρας μας. Τα δείγματα αίματος που συγκεντρώθηκαν από τα ορνίθια των 39 εκτροφών ελήφθησαν από τη σφαγίτιδα φλέβα και παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι το σχηματισμό πήγματος. Στη συνέχεια ο ορός μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα φιαλίδια και διατηρούνταν στους -70°C μέχρι να εξετασθούν. Συνολικά εξετάστηκαν 258 οροί από τους οποίους οι 147 προέρχονταν από 26 εκτροφές κρεοπααραγωγών ορνιθίων ηλικίας από 1 ημέρας μέχρι 45 ημερών, οι 104 από 11 εκτροφές πατρογονικών σμηνών κρεοπααραγωγών ορνιθίων ηλικίας 1 ημέρας μέχρι 9,5 μηνών και οι 7 οροί από 2 εκτροφές ωοπααραγωγών ορνιθίων ηλικίας 4 και 15 ημερών.

Για την εκτέλεση της δοκιμής της ELISA χρησιμοποιήσαμε ορνίθιο Αντιορό CAV (Anti-CAV- serum) και ορνίθιο αρνητικό ορό (Negative contro serum-chicken) τους οποίους προμηθευτήκαμε από το Central Veterinary Laboratory, U.K..

Το αντιγόνο προέρχονταν επίσης από το Central Veterinary Laboratory, U.K..

Το Anti-chicken IgG Alkaline Phosphate conjugate (σύζευγμα) ήταν της εταιρείας SIGMA.

Ο δείκτης (Substrate) ήταν επίσης της εταιρείας SIGMA.

Τεχνική της δοκιμασίας ELISA

Η δοκιμασία έγινε σε αποστειρωμένες πλάκες από πολυστυρένιο με 96 βοθρία (96-well plastic microplate, Nunc, Danmark) και ακολούθησε τα στάδια της τεχνικής που περιγράφεται από του Otaki και συνεργάτες²³ με ορισμένες τροποποιήσεις.

Οι αραιώσεις του αντιγόνου (1:300), του θετικού και αρνητικού ορού (1:100) σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα υπολογίστηκαν κατόπιν τιτλοποιήσεων. Οι

αραιώσεις του συζεύγματος (1:2000) και του δείκτη (1:1) ήταν αυτές που υποδεικνύουν οι αντίστοιχοι οίκοι παρασκευής τους.

Σε κάθε βοθρίο της πλάκας τοποθετήθηκε ποσότητα 10μl αντιγόνου αραιωμένου 1:300 σε 0,1 M NaHCO₃+0,1 M Na₂CO₃, pH9,6 επί 1 ώρα. Έπειτα απομακρύνθηκε η περίσσεια του αντιγόνου με διάλυμα Tween 20 (0,5ml/lit DW). Δύο βοθρία καλύφθηκαν με ποσότητα 100μl ανά βοθρίο θετικού ορού κατάλληλα αραιωμένου σε PBS, pH 7,2 και άλλα δύο βοθρία με την ίδια ποσότητα ομοίως αραιωμένου αρνητικού ορού. Οι υπό εξέταση οροί αραιώθηκαν όπως ο θετικός και αρνητικός ορός και ποσότητα 100μl του δείγματος τοποθετήθηκε ανά βοθρίο. Ακολούθησε επώαση στους 37°C επί μία ώρα, απόρριψη της περισσειας των αντισωμάτων με αναστροφή της πλάκας, πλύση αυτής όπως παραπάνω και τοποθέτηση σε κάθε βοθρίο 100μl συζεύγματος αραιωμένου 1:2000 σε PBS. Η πλάκα παρέμεινε στους 37°C επί 1 ώρα και στη συνέχεια η περίσσεια του συζεύγματος απορρίφθηκε και η πλάκα πλύθηκε. Αμέσως μετά ακολούθησε η προσθήκη 100μl ανά βοθρίο του δείκτη του ενζύμου του συζεύγματος (p-nitrophenyl Phosphate, Disodium 6H₂O) αραιωμένου 1:1 σε αραιωτικό αντιγόνου με pH 9,8 και επώαση της πλάκας στους 37°C επί μισή ώρα. Η παρουσία του συζεύγματος πάνω στο άνοσο σύμπλοκο διαπιστώθηκε με τη βοήθεια του δείκτη από την εμφάνιση κιτρινωπού χρώματος. Η ένταση του χρώματος που παρήχθη από τα προϊόντα υδρόλυσης του δείκτη, μετρήθηκε σε κάθε βοθρίο χωριστά, με την τοποθέτηση της πλάκας σε πολυκάναλο φωτόμετρο (TOYO, PLATE ANALYZER, ETY-III, Tokyo Japan) με φίλτρο μήκους κύματος 405 nm (τιμή απορρόφησης, absorbance, A/405nm).

Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση ορών σχηματίστηκαν τέσσερις ομάδες, ανάλογα με την τιμή απορρόφησης κάθε ορού (ομάδα Α: "ήπια ή αμφίβολα θετικοί", Β: "μέτρια θετικοί", Γ: "ισχυρά ή έντονα θετικοί", Δ: "αρνητικοί")²⁴.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 ελέγχθηκαν 39 εκτροφές και εξετάστηκαν συνολικά 258 οροί. Από αυτούς οι 68 ήταν θετικοί και οι 190 αρνητικοί.

Οι θετικοί οροί προέρχονταν από 5 εκτροφές πατρογονικών σμηνών κρεοπααραγωγών ορνιθίων ηλικίας 70 ημερών, 2,5, 5,5, 6 και 9,5 μηνών (πίνακας 1), καθώς και από 15 εκτροφές κρεοπααραγωγών ορνιθίων από τις οποίες 2 είχαν νεοσσούς ηλικίας 1 ημέρας και οι υπόλοιπες 13 εκτροφές ορνίθια ηλικίας 8, 15, 16, 28, 38, 42,43 και 45 ημερών αντίστοιχα (πίνακας 3). Οι υπόλοιποι οροί οι προερχόμενοι από 6 εκτροφές πατρογονικών σμηνών κρεοπααραγωγών ορνιθίων, από 11 εκτροφές κρεοπααραγωγών ορνιθίων και 2 εκτροφές ωοπααραγωγών ορνιθίων ήταν αρνητικοί (πίνακας 1,2,3,4).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα εξέτασης ορών ορνιθίων από 39 εκτροφές στην ELISA με αντιγόνο ιού CAV

Εξετάσθηκαν	Αρνητικοί	Δείγματα ορών (%)			
		Θετικοί			
		Ήπια	Μέτρια	Ισχυρά	Σύνολο θετικών
258	190 (73)	21 (30,9)*	23 (33,8)*	24 (35,2)*	68 (26,4)

* % στο σύνολο των θετικών αποτελεσμάτων της ELISA

Πίνακας 2. Αποτελέσματα εξέτασης ορών ορνιθίων από 11 εκτροφές γεννητόρων κρεοπαραγωγών ορνιθίων στην ELISA με αντιγόνο ιού CAV.

Αριθμός εκτροφών	Ηλικία	Εξετάσθηκαν	Αρνητικοί	Δείγματα ορών (%)			
				Θετικοί			
				Ήπια	Μέτρια	Ισχυρά	Σύνολο θετικών
2	1 ημ	20	20	-	-	-	-
1	2 ημ	20	20	-	-	-	-
1	8 ημ	14	14	-	-	-	-
2	29 ημ	10	10	-	-	-	-
1	70 ημ	10	2	6	2	-	8
1	2,5 μην	4	-	-	3	1	4
1	5,5, μην	10	-	-	7	3	10
1	6 μην	10	-	-	7	3	10
1	9,5 μην	6	-	-	-	6	6
11		104	66 (63)	6	19	13	38 (36,5)

Πίνακας 3. Αποτελέσματα εξέτασης ορών ορνιθίων από 26 εκτροφές κρεοπαραγωγών ορνιθίων στην ELISA με αντιγόνο ιού CAV.

Αριθμός εκτροφών	Ηλικία	Εξετάσθηκαν	Αρνητικοί	Δείγματα ορών (%)			
				Θετικοί			
				Ήπια	Μέτρια	Ισχυρά	Σύνολο θετικών
2	1 ημ	8	-	-	1	7	8
2	2 ημ	19	19	-	-	-	-
1	8 ημ	2	1	1	-	-	1
1	10 ημ	2	2	-	-	-	-
1	11 ημ	2	2	-	-	-	-
2	15 ημ	37	27	3	7	-	10
1	16 ημ	5	4	1	-	-	1
1	18 ημ	2	2	-	-	-	-
1	20 ημ	4	4	-	-	-	-
1	22 ημ	5	5	-	-	-	-
1	25 ημ	6	6	-	-	-	-
4	28 ημ	14	12	-	2	-	2
1	30 ημ	4	4	-	-	-	-
1	32 ημ	4	4	-	-	-	-
1	38 ημ	6	4	2	-	-	2
1	41 ημ	2	2	-	-	-	-
1	42 ημ	8	7	1	-	-	1
1	43 ημ	8	6	2	-	-	2
2	45 ημ	9	6	3	-	-	3
26		147	117 (79,7)	13	10	7	30 (20)

Πίνακας 4. Αποτελέσματα εξέτασης ορών ορνιθίων από 2 εκτροφές ωοπαραγωγών ορνιθίων στην ELISA με αντιγόνο ιού CAV.

Αριθμός εκτροφών	Ηλικία	Εξετάσθηκαν	Αρνητικοί	Δείγματα ορών			
				Θετικοί			
				Ήπια	Μέτρια	Ισχυρά	Σύνολο θετικών
1	4 ημ	5	5	-	-	-	-
1	15 ημ	2	2	-	-	-	-
2		7	7	-	-	-	-

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την εργασία αυτή ανακοινώνονται οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι του ιού της λοιμώδους αναιμίας (CAV) σε ορνιθειούς πληθυσμούς που εκτρέφονται στη χώρα μας.

Όσον αφορά τα πατρογονικά σμήνη που ελέγχθηκαν, θετικοί οροί βρέθηκαν σε 5 εκτροφές ορνιθίων ηλικίας 70 ημερών, 2,5, 5,5, 6 και 9,5 μηνών. Η παρουσία αντισωμάτων στην ηλικία αυτή υποδηλώνει φυσική μόλυνσή τους από το CAV, διότι στις εκτροφές αυτές δεν διενεργήθηκε σχετικός εμβολιασμός και η ηλικία τους δεν δικαιολογεί παρουσία μητρικών αντισωμάτων, τα οποία, όπως είναι γνωστό, παραμένουν μέχρι την ηλικία των 3 εβδομάδων.

Η φυσική μόλυνση των γεννητόρων πριν από την έναρξη της ωοπαραγωγής (3,5 - 5 μηνών) είναι επιθυμητή και μάλιστα ενδείκνυται στην ηλικία αυτή με σκοπό την ανοσοποίησή τους. Στην περίπτωση αυτή οι γεννητόρες δεν νοσούν ενώ προμηθεύουν μητρικά αντισώματα στους απογόνους τα οποία τους προστατεύουν κατά τις 2 πρώτες ευαίσθητες εβδομάδες της ζωής τους²³.

Απεναντίας η απουσία αντισωμάτων έναντι του CAV στα πατρογονικά σμήνη κατά την έναρξη της ωοπαραγωγής υποδηλώνει, ότι σε μία ενδεχόμενη φυσική μόλυνσή τους είναι δυνατόν να μεταδώσουν κάθετα τον ιό στους νεοσσούς απογόνους τους, οι οποίοι θα εκδηλώσουν τη νόσο.

Από τον έλεγχο των εκτροφών κρεοπαραγωγών ορνιθίων προκύπτει ότι μικρό ποσοστό των ορνιθίων αυτών διαθέτουν μητρικά αντισώματα. Συγκεκριμένα βρέθηκαν θετικοί οροί σε 2 εκτροφές με νεοσσούς ηλικίας μιας ημέρας και σε 13 εκτροφές με ορνίθια ηλικίας 8, 15, 16, 28, 38, 42, 43 και 45 ημερών. Όσον αφορά τις εκτροφές ωοπαραγωγών σιμνών ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που ελέγχθηκε ήταν αρνητικός. Η απουσία αντισωμάτων στα νεαρά κρεοπαραγωγά και ωοπαραγωγά ορνίθια υποδηλώνει ότι τα ορνίθια αυτά προέρχονται από μη άνοσους γεννήτορες. Σε αυτά τα ορνίθια είναι δυνατόν μετά από οριζόντια μετάδοση του ιού να εκδηλωθεί υποκλινική μορφή της νόσου, που επιφέρει σοβαρές οικονομικές απώλειες όπως και η κλινική της

μορφή. Θα πρέπει να αναφερθεί, ότι η οριζόντια μετάδοση του CAV στα νεαρά μη άνοσα ορνίθια, είναι δυνατόν σε περίπτωση σύγχρονης μόλυνσης με τον ιό της νόσου Gumboro ή της νόσου του Marek ή της Δικτυοενδοθηλίωσης να καταλήξει σε κλινική νόσο.

Συμπερασματικά λοιπόν από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής προκύπτει ότι:

α) Η λοιμώδης αναιμία των ορνιθίων (CAV) υπάρχει και στη χώρα μας. Το γεγονός αυτό ενισχύει τις προηγούμενες κλινικές μας παρατηρήσεις σχετικά με την παρουσία της νόσου αυτής στις εκτροφές των κρεοπαραγωγών κυρίως ορνιθίων και εξηγεί την εμφάνιση της γαγγραινώδους δερματίτιδας, την οποία ενίοτε παρατηρούμε στην ηλικία των 3 εβδομάδων περίπου δίχως να υπάρχουν αλλοιώσεις της νόσου του Gumboro ή της ηπατίτιδας με έγκλειστα νοσήματα, τα οποία συνήθως ακολουθεί η γαγγραινώδης δερματίτιδα. Από τον έλεγχο των δύο εκτροφών ωοπαραγωγών ορνιθίων προκύπτει ότι και οι δύο εκτροφές ήταν αρνητικές. Η σημασία όμως του αποτελέσματος είναι περιορισμένη λόγω του μικρού αριθμού των εκτροφών που εξετάσθηκαν.

β) Τα σμήνη γεννητόρων πριν από την έναρξη της ωοπαραγωγής τους (κατά τη φάση της ανάπτυξής τους) θα πρέπει να ελέγχονται εάν είναι φορείς αντισωμάτων έναντι του ιού της λοιμώδους αναιμίας των ορνιθίων. Στα αρνητικά σμήνη θα μπορούσαν να διενεργηθούν εμβολιασμοί. Με τον τρόπο αυτό θα αποτρέπεται η κάθετη μετάδοση του ιού, οι δε νεοσσοί θα είναι φορείς αντισωμάτων τα οποία θα τους προστατεύουν κατά την ευαίσθητη ηλικία των 3 πρώτων εβδομάδων της ζωής τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and characteristics of an agent inducing anaemia in chicks. Av Dis 1979, 23:366-385.
2. Goryo M, Shibata Y, Suwa T, Umemura T, Itakura C. Outbreak of anaemia associated with chicken anaemia agent in young chicks. Jpn J Vet sci, 1987b, 49:867-873.
3. Engstrom B E. Blue wing disease of chickens: isolation of avian rotavirus and chicken anaemia agent. Av Path, 1988, 13:1-12.
4. Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Nomura Y. Natural

- infection in chicks with the chicken anaemia agent. *J of Jpn Vet Medical Ass*, 1988, 41:335-338.
5. Vielitz E, Langraf H. Anaemia dermatitis of broilers: field observations on its occurrence, transmission and prevention *Av Path*, 1988, 17:113-120.
 6. Chettle N J, Eddy R K, Wyeth P J, Lister S A. An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. *Vet Rec*, 1989, 124:211-215.
 7. Goodwin M A, Brown J, Miller S L, Smeltzer M A, Steffens W L, Waltman W D. Infectious anaemia caused by a parvovirus-like virus in Georgia broilers. *Av Dis*, 1989, 33:438-445.
 8. Rosenberger JK, Clud SS. The isolation and characterization of chicken anaemia agent (CAA) from broilers in the United State. *Av Dis*, 1989a, 33:707-713.
 9. McNulty M S, Connor T J, McNeilly F, Mc Loughlin M F, Kirkpatrick K S. Preliminary characterisation of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom *Av Path*, 1990a, 19:67-73.
 10. Goryo M, Sigmura H, Matsumoto S, Umemura T, Itakura C. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Av Path*, 1985, 14:483-496.
 11. Bulow V von, Rudolph R, Fuchs B. Erhohte Pathogenitat des Erregers der aviaraen infektiösen Anämie bei Hühnerkuken (CAA) bei simultaner Infektion mit Virus der Mareksche Krankheit (MDV), Bursitivirus (BDV) oder Reticuloendotheliose virus (REV). *Journal of Vet Med*, 1986a, B33:93-116.
 12. Bulow V von, Rudolph R, Fuchs B. Folgen der Doppelinfektion von Kuken mit Adenovirus oder Rorivirus und dem Erreger der aviaren infektiösen Anämie (CAA). *Zentralblatt für Veterinarmedizin*, 1986b, B33:717-726.
 13. Otaki Y, Tajima M, Saito K, Normura Y. Immune response of chicks inoculated with chicken anaemia agent alone or in combination with Marek's disease virus of turkey herpes-virus. *Jpn J Vet sci* 1988, 50:1040-1047.
 14. Otaki Y, Nunoya T, Tajima M, Kato A, Nomura Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anaemia agent. *Av Path*, 1988, 17:333-347.
 15. Yasa N, Yoshida I. Experimental egg transmission of chicken anaemia agent. *National Animal Health Quarterly*, 1983, 23:99-100.
 16. Yasa N, Tangiguchi T, Nuguchi T, Yoshida I. Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anemia by chicken anaemia agent. *Av Dis*, 1980, 24: 202-209.
 17. Rosenbergen J K, Cloud S S. The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anaemia agent (CAA). *Av Dis*, 1989b, 33: 753-759.
 18. MacNulty M S, Connor T J, Neneilly F. Influence of virus dose on experimental anaemia due to chicken anaemia agent. *Av Path*, 1990b, 19:167-171.
 19. Birgaard M. An age related and breeder flock associated Haemorrhagic disorder in Danish broiler. *Nordisk Veterinær Medicin*, 1983, 35:397-407.
 20. Engstrom B E, Luthman M. Blue wing disease of chickens: signs, pathology and natural transmission. *Av Path*, 1984, 13:1-12.
 21. Bulow V von, Fuchs B, Vielitz E, Landgraf H. Frühsterblichkeits syndrom bei kuken nach Doppelinfektion mit dem Virus der Marekschen Krankheit (MDV) und einem Anämieerreger (CAA). *Zentralblatt für Veterinarmedizin*, 1983, B30:742-750.
 22. MacNulty MS. Chicken anaemia agent. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 2nd ed, Dubuque, Iowa: Kendal/Hunt Publishing Company, 1989:108-109.
 23. Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y. Detection of antibody to chicken anaemia agent: a comparison of three serological tests. *Av Path*, 1991, 20:319-328.
 24. Haralabidis S. *Th Ann Trop Med Parasitol*, 1984a, 78:295-300.