

KẾT QUẢ PHÁT HIỆN *Avian nephritis virus* (ANV) Ở GÀ TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Văn Giáp¹, Đào Đoàn Trang², Lê Thị Trinh³,
Nguyễn Quang Đức³, Cao Thị Bích Phượng¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ^{1*}

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Thực nghiệm và Bảo tồn vật nuôi, Viện Chăn nuôi

³Công ty cổ phần Thú y xanh (Greenvet)

*Tác giả liên hệ: huynhhtmle@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.06.2021

Ngày chấp nhận đăng: 10.01.2022

TÓM TẮT

Bệnh viêm thận ở động vật thuộc lớp chim (avian nephritis) là bệnh truyền nhiễm gây ra bởi một số loại virus, trong đó có virus gây bệnh Viêm phế quản truyền nhiễm (*Infectious bronchitis virus*, IBV) và *Avian nephritis virus* (ANV). Ở Việt Nam, bệnh tích viêm thận thường được chẩn đoán liên quan tới IBV. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật RT-PCR được dùng để phát hiện ANV. Kết quả đã phát hiện ANV ở ca bệnh có bệnh tích viêm thận tích muối urat và âm tính với IBV. Giải mã và phân tích trình tự gen ORF1a của chủng G19.24.2 cho thấy chủng này tương đồng 95,3% so với chủng ANV/CHN/BJCP510-2/2018 (MN732558) phát hiện tại Trung Quốc năm 2018. Dựa vào đặc điểm phân nhánh của cây phát sinh chủng loại, chủng ANV phát hiện trong nghiên cứu được xếp vào genotype 7.

Từ khóa: *Avian nephritis virus*, RT-PCR, đặc điểm sinh học phân tử.

A Preliminary Investigation of *Avian Nephritis Virus* (ANV) in Vietnam**ABSTRACT**

Avian nephritis is an infectious diseases induced by several viruses, such as *Infectious bronchitis virus* (IBV) and *Avian nephritis virus* (ANV). In Vietnam, uric acid nephropathy found in sick chickens is commonly assigned as an infectious bronchitis virus-nephrosis form. In this report, RT-PCR method was applied for ANV detection. The presence of ANV was confirmed in a sick chick having nephritis with urate deposition in the absence of IBV infection. By genetic comparison of ORF1a sequences with the length of 447 nucleotides, the G19.24.2 virus strain were 95.30% similarity with a well characterized ANV/CHN/BJCP510-2/2018 strain (GenBank accession MN732558) detected in China in 2018. By phylogenetic classification, the ANV strain detected in this study was grouped with genotype 7 of ANV.

Keywords: *Avian nephritis virus*, RT-PCR, molecular characterization.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm thận ở động vật thuộc lớp chim (avian nephritis) là một bệnh truyền nhiễm gây ra bởi *Avian nephritis virus* (ANV), một thành viên của giống *Avastrovirus*, họ *Astroviridae* (Pantin-Jackwood & cs., 2012). ANV lưu hành phổ biến ở đàn gà thịt khắp nơi trên thế giới và hầu hết các thể bệnh là cận lâm sàng. Cùng với hai loại virus là IBV (*Infectious bronchitis virus*) (Meulemans & Van Den Berg, 2019) và

CAstV (*Chicken astrovirus*) (Smyth, 2017) ANV là một trong những nguyên nhân gây bệnh viêm thận ở gà thịt (Imada & cs., 1979; Imada & cs., 2000). Về phân loại, theo ủy ban quốc tế về phân loại virus (ICTV) họ *Astroviridae* bao gồm 2 giống là *Mamastrovirus* (MAstV) lây nhiễm cho động vật thuộc lớp thú và *Avastrovirus* (AAstV) lây nhiễm cho động vật thuộc lớp chim. Giống *Avastrovirus* bao gồm 3 loài ký hiệu là *Avastrovirus 1* (AAstV-1), *Avastrovirus 2* (AAstV-2), và *Avastrovirus 3* (AAstV-3). Virus

gây viêm thận ANV thuộc loài AAV-2 (Donato & Vijaykrishna, 2017). Ngoài phản ứng huyết thanh học, các chủng ANV có thể phân biệt được bằng so sánh trình tự gen mã hóa protein phi cấu trúc (Mandoki & cs., 2006) hoặc gen mã hóa capsid protein (Todd & cs., 2011). Do tính đa dạng về mặt di truyền ANV được phân chia thành 7 genotype 1-4, 7,8 và 10 (dựa vào toàn bộ gen virus) hoặc 11 genotype 1-11 (dựa vào trình tự gen ORF2) (Lagan Tregaskis & cs., 2021). Cho đến thời điểm hiện tại, ở Việt Nam, chưa có công bố nào về bệnh viêm thận do ANV nói chung, cũng như sự hiện diện của ANV ở gà nói riêng. Trong khuôn khổ của bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phát hiện ANV và phân tích đặc điểm sinh học phân tử của virus ở ca bệnh có bệnh tích viêm thận tích muối urat, thu thập ở gà Lạc Thủy 4-5 tuần tuổi, nuôi tại Hà Nội năm 2019.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu

Đối tượng của nghiên cứu là ANV gây bệnh viêm thận ở gà Lạc Thủy nuôi tại Hà Nội.

Các cặp mồi đặc hiệu để phát hiện IBV, ANV và giải mã gen ORF1a được trình bày ở bảng 1.

Kít tách ARN (Patho Gene-spin DNA/RNA Extraction Kit, 17154, iNtRON); kít tổng hợp cDNA (HiSenScript RH(-) RT PreMix kit, 25087, iNtRON); kít PCR (Maxime PCR PreMix kit, i-StarMAX II, 25281, iNtRON).

Hóa chất dùng phân tích sản phẩm PCR gồm: agarose (BIO-41025, Bioline); RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (21141, iNtRON) và 100bp DNA ladder (DM001-R500, GeneDireX Inc.).

Nhóm vật liệu phục vụ phân tích đặc điểm di truyền:

- Trình tự gen ORF1a được giải mã của mẫu bệnh phẩm dương tính với ANV. Mẫu bệnh phẩm lấy từ gà 5 tuần tuổi, giống Lạc Thủy, có bệnh tích viêm thận tích muối urat, thu thập tại Hà Nội năm 2019.

- Trình tự gen ORF1a (n = 25) của ANV từ GenBank (truy cập tháng 5/2021).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phát hiện IBV và ANV

Mẫu bệnh phẩm là mẫu gộp phủ tạng, gồm: thanh quản, khí quản, phổi; thận; hạch lympho manh tràng. Mẫu được nghiền bằng cối chày sứ và hòa thành huyền dịch 10% trong đệm PBS 1X. Tách ARN tổng số của huyền dịch bệnh phẩm bằng Patho Gene-spin DNA/RNA Extraction Kit, với các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chuyển ARN thành cDNA sử dụng kít RT PreMix ở nhiệt độ 45°C trong 60 phút. IBV được phát hiện bằng phản ứng nested RT-PCR với PCR vòng ngoài dùng cặp mồi UTR1/UTR2 và cặp mồi vòng trong là UTR3/UTR4. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR (vòng ngoài, vòng trong) gồm 94°C trong 4 phút, theo sau là 35 chu kỳ gồm: 94°C - 15 giây, 55°C - 20 giây, 72°C - 30 giây. Phản ứng RT-PCR phát hiện nucleic acid của ANV dùng mồi ORF1a.F/R theo nghiên cứu trước đây (Mandoki & cs., 2006).

2.2.2. Giải mã và phân tích trình tự nucleotide

Để thu được trình tự gen ORF1a của ANV, sản phẩm PCR được giải mã bằng phương pháp Sanger's, thực hiện bởi Công ty 1st BASE (Malaysia). Căn chỉnh trình tự gen ORF1a và dịch mã bằng phần mềm BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999). Tìm kiếm trình tự tương đồng bằng chương trình BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phân tích tính đa dạng trình tự nucleotide được thực hiện bởi phần mềm DnaSP v6 (Rozas & cs., 2017). Các chương trình tin sinh học kể trên được dùng với tham số mặc định.

Trên cơ sở trình tự gen ORF1a thu được, sử dụng phần mềm IQ-TREE 2 (Minh & cs., 2020) để xây dựng cây phát sinh chủng loại của *Avastrovirus* với các tham số như sau: (i) phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại là maximum likelihood; (ii) mô hình mô phỏng sự thay đổi nucleotide giữa các trình tự gen được lựa chọn tự động bằng câu lệnh “-m TEST”; (iii) mức tin cậy ở các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính theo phương pháp transfer bootstrap expectation (Lemoine & cs., 2018), với phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần.

Bảng 1. Trình tự mỗi đặc hiệu dùng trong nghiên cứu

Virus	Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Nguồn gốc
IBV	UTR1	GCTCTAACTCTATACTAGCCTAT	Adzhar & cs. (1996)
	UTR2	AAGGAAGATAGGCATGTAGCTT	
	UTR3	GTCCTAGTGCTGTACCCTCG	
	UTR4	GTCTATCGCCAGGGAATGTCT	
ANV	ORF1a.F	AGATACGCTTGCTCGTCTTG	Mandoki & cs. (2006)
	ORF1a.R	CCTCTAACCGGCATATTCT	

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tóm tắt ca bệnh và kết quả phát hiện virus gây viêm thận

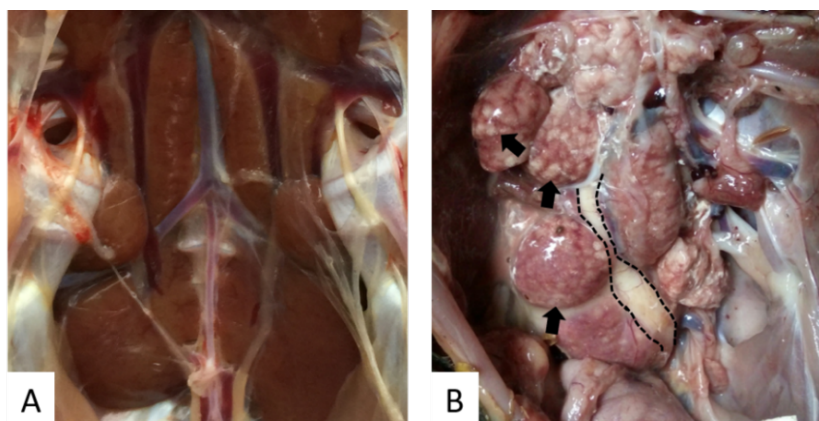
Trong quá trình theo dõi tình trạng bệnh ở một đàn gà vào tháng 3/2019, cán bộ thú y cơ sở quan sát thấy nhiều cá thể trong đàn gà Lạc Thủy 4-5 tuần tuổi có triệu chứng hô hấp. Mở khám gà ốm/chết cho biết: ngoài bệnh tích sung huyết thanh - khí quản (không trình bày), các ca bệnh đều có thận nhạt màu, hơi sưng, với niệu quản có nhiều dịch màu trắng (Hình 1B).

Về mặt lâm sàng, cán bộ thú y cơ sở nghi gà mắc bệnh IB thể thận và có khả năng ghép tình trạng rối loạn chuyển hóa muối urat. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm không phát hiện thấy IBV ở ca bệnh này dù đã dùng phương pháp nested RT-PCR, là phương pháp có độ nhạy gấp 100 lần so với phương pháp RT-PCR thông thường (Kho & cs., 2000). Trên cơ sở tìm hiểu các

nghiên cứu về bệnh ở gà có bệnh tích thận nhạt màu, nhóm nghiên cứu đã xét nghiệm và phát hiện được virus gây viêm thận (ANV) ở ca bệnh kể trên. Để khẳng định chắc chắn, sản phẩm PCR (nhân lên bởi cặp mỗi ORF1a.F/ ORF1a.R, Bảng 1) đã được giải mã, với 447 nucleotide có tín hiệu rõ ràng. Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng ở GenBank cho thấy trình tự nucleotide kiểm tra là ANV do giống 95,30% so với chủng virus gây viêm thận ở loài cầm đã công bố ANV/CHN/BJCP510-2/2018 (mã số MN732558).

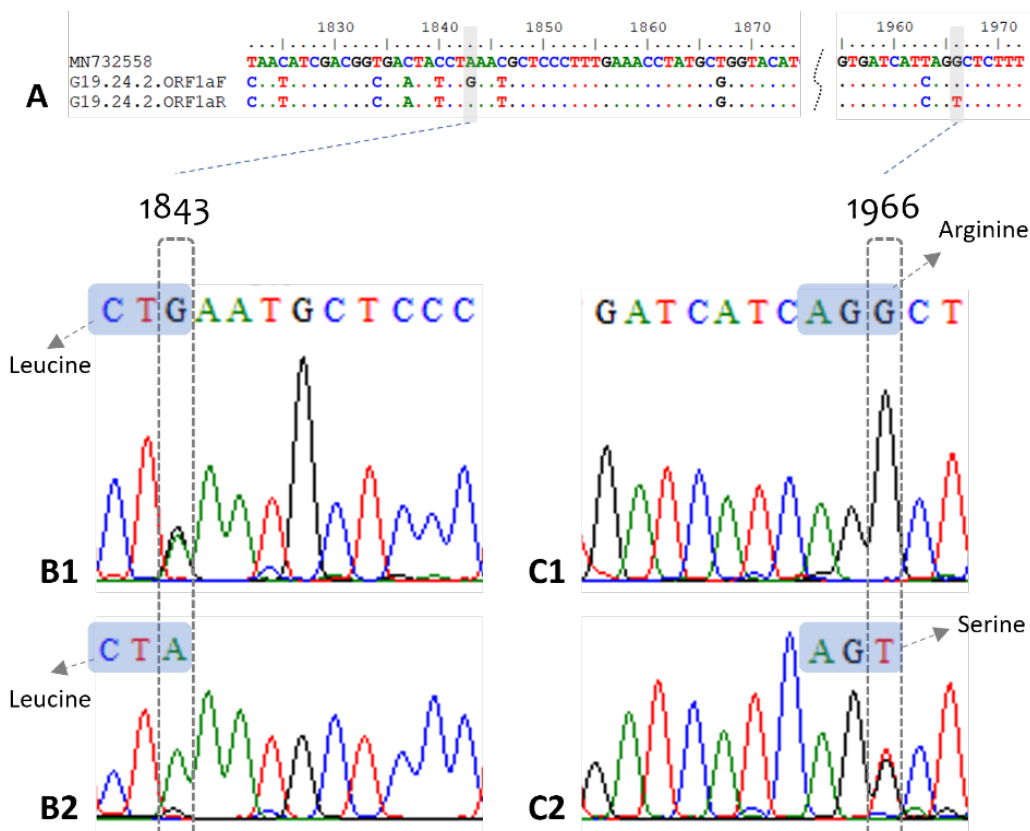
3.2. Trình tự gen của virus gây viêm thận-đa hình nucleotide

Dựa vào bộ gen chủng ANV tham chiếu (MN732558), đã lắp ráp được trình tự nucleotide gen ORF1a được giải mã theo chiều xuôi và chiều ngược và phát hiện có 2 vị trí đa hình nucleotide (Hình 2A).



Ghi chú: Màu thận của gà khỏe (A) và của gà dương tính ANV (B). Các thùy nhạt màu và nhìn rõ các đám urat màu trắng (mũi tên). Giới hạn bởi đường nét đứt là niệu quản chứa đầy dịch màu trắng.

Hình 1. Bệnh tích ở thận của ca bệnh dương tính ANV



Ghi chú: So sánh trình tự theo chiều xuôi và chiều ngược của chủng G19.24.2 với chủng tham chiếu (A). Đa hình (polymorphism) ở nucleotide 1843 G/A (B1, B2) và 1966 G/T (C1, C2). Thứ tự nucleotide được đánh số theo trình tự MN732558. Dấu “.” biểu thị nucleotide giống với trình tự ở hàng trên cùng.

Hình 2. Kết quả giải trình tự gen ORF1a của ANV

Đa hình nucleotide đã được khẳng định dựa vào phân tích giản đồ giải trình tự (Hình 2B1, 2C2). Cụ thể, vị trí 1843 và 1966 đều xuất hiện đỉnh tín hiệu kép, không có các tín hiệu nhiễu ở các vị trí xung quanh. Mặc dù hai đa hình nucleotide đều ở vị trí thứ 3 của bộ ba mã hóa, nhưng đa hình ở vị trí 1966 đã dẫn tới thay đổi amino acid được mã hóa hoặc Arginine (AGG) hoặc Serine (AGT). Trong khi đó, đa hình ở vị trí 1843 không làm thay đổi amino acid được mã hóa là Leucine (mã hóa bởi CTG hoặc CTA). Hiện tượng đa hình nucleotide này chứng tỏ sự có mặt của các biến thể khác nhau virus ANV trong mẫu bệnh phẩm. Đặc điểm trên phù hợp với kết quả công bố của Chamings & cs. (2015), trong đó đã tìm thấy hai biến thể ANV ở phần lớn các mẫu xét nghiệm và sự hiện diện đồng thời của nhiều biến thể virus trong cùng một đàn gà là phổ biến.

3.3. Trình tự gen của virus gây viêm thận - mức tương đồng nucleotide

Để làm rõ mức tương đồng, nghiên cứu đã so sánh trình tự nucleotide một phần gen ORF1a giữa chủng ANV của Việt Nam với 25 chủng ANV được công bố ở GenBank (Hình 3). Nhằm đảm bảo tất cả các vị trí được so sánh của 25 chủng đều có nucleotide, các vị trí khuyết nucleotide được xóa bỏ và giữ lại đoạn gen gồm 447 nucleotide.

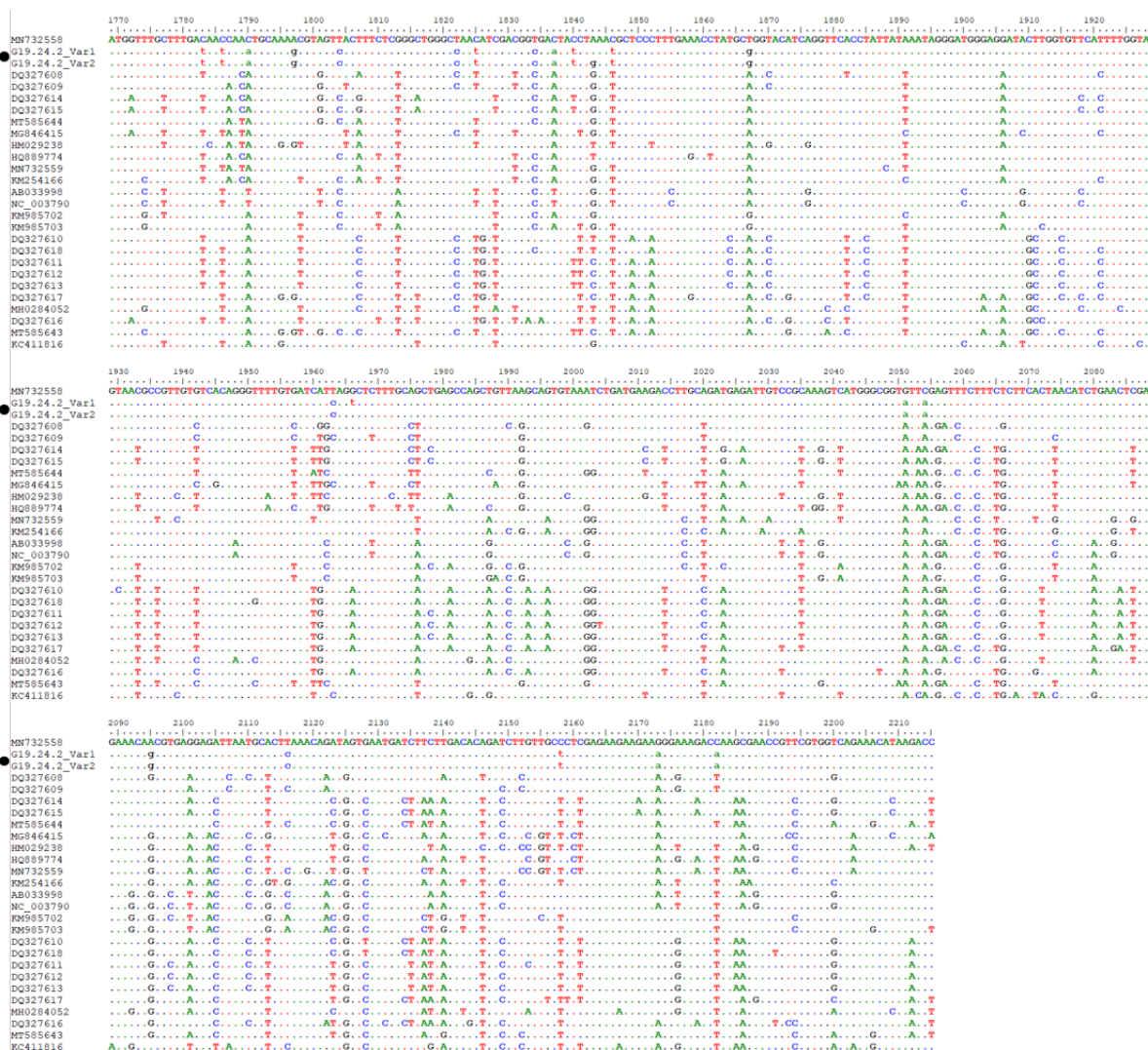
Kết quả ở hình 3 cho thấy: trình tự đoạn gen ORF1a giữa 2 biến thể của Việt Nam và 25 chủng ANV tham chiếu rất đa dạng, với 179/447 (chiếm 40,04%) vị trí có biến đổi nucleotide. Trong số này, 153 vị trí (chiếm 34,23%) được xếp vào nhóm “vị trí có thông tin” (parsimony-informative site, là vị trí mà ở đó có ít nhất 2 sự thay đổi loại nucleotide và mỗi một loại thay đổi nucleotide xuất hiện ở ít nhất 2 trình tự khác

nhau). Các “vị trí có thông tin” này phân bố rải rác trên dọc chiều dài đoạn gen được so sánh. Kết quả tính mức tương đồng trình tự nucleotide của 27 chủng (Hình 3) dao động từ 80,50% đến 99,70%. Trình tự phân đoạn ORF1a hai biến thể ANV của mẫu G19.24.2 giống 81,20% đến 95,30% so với 25 chủng ANV thu thập từ GenBank. Tính đa dạng cao của ANV nói riêng và *Avastrovirus* nói chung đã được chỉ ra trước đây (Todd & cs., 2011; Pantin-Jackwood & cs., 2012; Donato & Vijaykrishna, 2017). Trong các nghiên cứu đó, không chỉ có gen mã hóa capsid protein (Todd & cs., 2011)

mà cả gen mã hóa protein phi cấu trúc (ORF1a, ORF1b) đều rất biến đổi (Mandoki & cs., 2006; Zhao & cs., 2011).

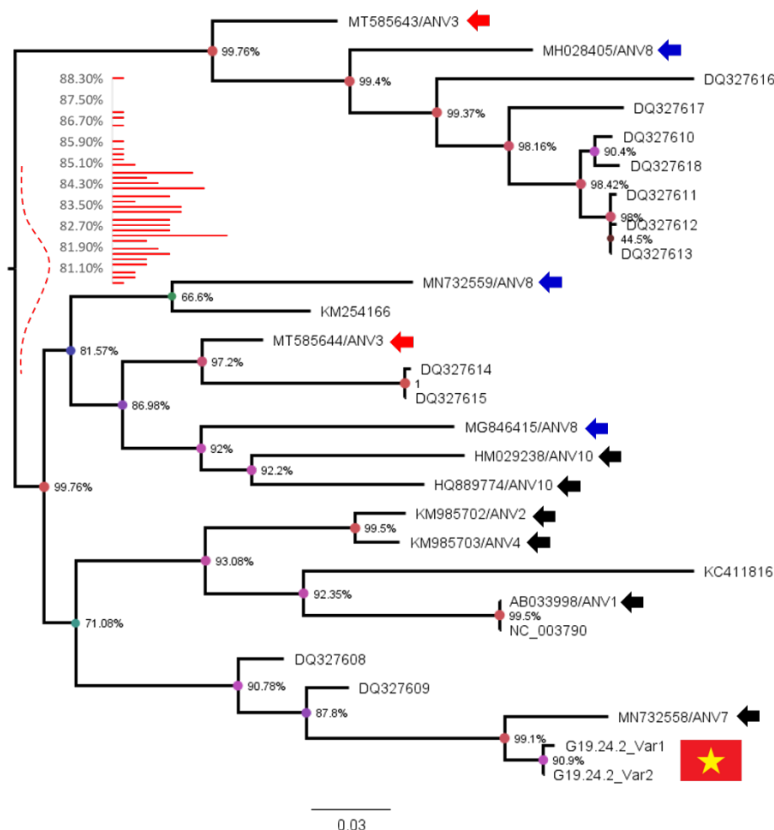
3.4. Mối liên hệ di truyền của virus gây viêm thận

Theo kết quả nghiên cứu mới nhất, ANV được chia thành 7 hoặc 11 genotype tùy thuộc vào trình tự gen dùng phân loại (Lagan & cs., 2021). Để làm rõ mối liên hệ di truyền của chủng ANV phát hiện, cây phát sinh chủng loại đã được dựng (Hình 4).



Ghi chú: Hai biến thể ANV phát hiện được trong mẫu G19.24.2 (đánh dấu) được so sánh với 25 chủng ANV thu thập ở ngân hàng gen. Thứ tự nucleotide được đánh số theo trình tự MN732558. Dấu “-” biểu thị nucleotide giống với trình tự ở hàng trên cùng.

Hình 3. So sánh trình tự một phần gen ORF1a giữa các chủng ANV



Ghi chú: 11 chủng ANV biết trước genotype (dựa vào trình tự genome) là tham chiếu, đánh dấu mũi tên. Giá trị ở các nút (node) biểu thị mức tin cậy cho phân nhánh. Thước đo (phía dưới) là số thay đổi ở mỗi vị trí nucleotide. Đồ thị đính kèm biểu thị phân bố mức tương đồng trình tự nucleotide giữa 2 nhánh lớn.

Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của ANV dựa vào gen ORF1a

Căn cứ đặc điểm phân nhánh của cây phát sinh chủng loại, 27 chủng ANV được chia thành 2 nhánh lớn với mức tương đồng nucleotide giữa các thành viên của 2 nhánh dao động từ 80,50% đến 88,30% (đồ thị tần suất đính kèm Hình 4). Mặc dù vậy, đặc điểm phân nhánh của 11 chủng biết trước genotype (Lagan & cs., 2021) không theo quy luật (mũi tên màu đỏ và màu xanh, Hình 4). Điều này cho thấy phân loại genotype ANV dựa vào các vùng gen khác nhau là khác nhau. Đặc điểm đó đã được biết đến trong các công bố về phân nhóm ANV (Zhao & cs., 2011; Espinoza & cs., 2016; Lagan Tregaskis & cs., 2021). Do tính đa dạng về di truyền ANV, các vùng gen không cấu trúc (ORF1a, ORF1b) cũng được dùng để phân loại virus (Mandoki & cs., 2006; Zhao & cs., 2011). Theo đó, việc phân nhóm AVN dựa vào gen ORF1a trong nghiên cứu này là phù hợp. Kết quả trình bày ở hình 4

cho biết chủng virus G19.24.2 nằm chung nhóm với ANV thuộc genotype 7 phát hiện được ở Trung Quốc năm 2018 (MN732558). Tuy nhiên, để có kết quả phân nhóm chính xác nhất, đồng thời làm rõ một cách toàn diện đặc điểm di truyền của chủng ANV phát hiện được, cần tiếp tục giải mã bộ gen của virus và phân loại dựa vào trình tự bộ gen và trình tự gen mã hóa capsid protein

Kết quả phát hiện ANV ở gà có bệnh tích viêm thận đặt ra yêu cầu nghiên cứu sự lưu hành và vai trò gây bệnh của ANV nói riêng và *Avastrovirus* nói chung ở đàn gà nuôi tại Việt Nam. Đa dạng di truyền của giống *Avastrovirus* trong đó ANV là một thành viên ngày càng được mở rộng do phát hiện thêm nhiều thành viên mới (Chu & cs., 2012; Fernandez-Correa & cs., 2019; Lagan & cs., 2021). Do vậy, hướng nghiên cứu tiếp theo về *Avastrovirus* nên kết hợp sử

dụng bộ mỗi phát hiện chung *Avastrovirus* và phương pháp amplicon sequencing trong xác định chủng loại *Avastrovirus* phát hiện được (Espinoza & cs., 2016; Kauer & cs., 2019).

4. KẾT LUẬN

Kết quả RT-PCR và giải trình tự gen đã khẳng định sự hiện diện của ANV ở gà bệnh có bệnh tích viêm thận tích muối urat. Dựa vào trình tự gen ORF1a, chủng ANV được xếp vào genotype 7 và giống 81,20% đến 95,30% so với 25 chủng ANV thu thập từ GenBank.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adzhar A., Shaw K., Britton P. & Cavanagh D. (1996). Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 25(4): 817-36.
- Chu D.K., Leung C.Y., Perera H.K., Ng E.M., Gilbert M., Joyner P.H., Grioni A., Ades G., Guan Y., Peiris J.S. & Poon L.L. (2012). A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *J Virol.* 86(24): 13772-8.
- Chamings A., Hewson K.A., O'rourke D., Ignjatovic J. & Noormohammadi A.H. (2015). High-resolution melt curve analysis to confirm the presence of co-circulating isolates of *avian nephritis virus* in commercial chicken flocks. *Avian Pathol.* 44(6): 443-51.
- Donato C. & Vijaykrishna D. (2017). The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. *Viruses.* 9(5): 102.
- Espinoza L.L., Beserra L.a.R., Soares R.M. & Gregori F. (2016). Turkey astrovirus type 1 (TastV-1) and chicken astrovirus (CAstV) detection in Brazilian chicken flocks. *Avian Diseases.* 60(3): 681-687.
- Fernandez-Correa I., Truchado D.A., Gomez-Lucia E., Domenech A., Perez-Tris J., Schmidt-Chanasit J., Cadar D. & Benitez L. (2019). A novel group of avian astroviruses from Neotropical passerine birds broaden the diversity and host range of Astroviridae. *Sci Rep.* 9(1): 9513.
- Hall T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Imada T., Yamaguchi S. & Kawamura. H. (1979). Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus "*avian nephritis virus*". *Avian Dis.* 23(3): 582-8.
- Imada T., Yamaguchi S., Mase M., Tsukamoto K., Kubo M. & Morooka A. (2000). *Avian nephritis virus* (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol.* 74(18): 8487-93.
- Kauer R.V., Koch M.C., Hierwege, M.M., Werder S., Boujon C.L. & Seuberlich T. (2019). Discovery of novel astrovirus genotype species in small ruminants, *PeerJ*, 7: e7338.
- Kho C.L., Mohd-Azmi M.L., Arshad S.S. & Yusoff K. (2000). Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J Virol Methods.* 86(1): 71-83.
- Lagan Tregaskis P., Devaney R. & Smyth V.J. (2021). The first whole genome sequence and characterisation of avian nephritis virus genotype 3. *Viruses.* 13(2).
- Lemoine F., Domelevo Entfellner J.B., Wilkinson E., Correia D., Davila Felipe M., De Oliveira T. & Gascuel O. (2018). Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature.* 556(7702): 452-456.
- Mandoki M., Bakonyi T., Ivanics E., Nemes C., Dobos-Kovacs M. & Rusvai M. (2006). Phylogenetic diversity of avian nephritis virus in Hungarian chicken flocks. *Avian Pathol.* 35(3): 224-9.
- Meulemans G. & Van Den Berg T.P. (2019). Nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *World's Poultry Science Journal.* 54(2): 145-153.
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M. D., Von Haeseler A. & Lanfear R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol.* 37(5): 1530-1534.
- Pantin-Jackwood M., Todd D. & Koci M.D. (2012). Avian Astroviruses. In: *Astrovirus Research*. Schultz-Cherry, S. (ed.). Springer New York New York, NY. pp. 151-180.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sanchez-Delbarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E. & Sanchez-Gracia A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol.* 34(12): 3299-3302.
- Smyth V.J. (2017). A review of the strain diversity and pathogenesis of chicken astrovirus. *Viruses.* 9(2): 29.
- Todd D., Trudgett J., Smyth V.J., Donnelly B., McBride N. & Welsh M.D. (2011). Capsid protein sequence diversity of avian nephritis virus. *Avian Pathol.* 40(3): 249-59.
- Zhao W., Zhu A.L., Yu Y., Yuan C.L., Zhu C.X., Yang Z.B., Cui L. & Hua X.G. (2011). Complete sequence and genetic characterization of pigeon *avian nephritis virus*, a member of the family Astroviridae. *Arch Virol.* 156(9): 1559-65.