

PHÁT HIỆN AVIAN POXVIRUS Ở ĐÀN VỊT NUÔI TẠI TỈNH HƯNG YÊN VÀ NINH BÌNH

Trần Thị Hương Giang^{1*}, Nguyễn Văn Giáp¹, Lê Thị Trinh², Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Công ty Cổ phần Thú y Xanh Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 28.11.2023

Ngày chấp nhận đăng: 12.06.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện để khẳng định sự hiện diện chủng virus gây bệnh Đậu gà ở vịt nuôi tại tỉnh Hưng Yên và Ninh Bình. Một số vịt có biểu hiện nổi nốt đậu ở phần mỏ và rìa viền mắt được phát hiện ở 3 đàn vịt nuôi tại huyện Văn Lâm, Hưng Yên và huyện Gia Viễn, Ninh Bình vào tháng 5-6 năm 2023. Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp polymerase chain reaction (PCR) cho thấy 3 mẫu gộp lấy từ vịt nghi mắc bệnh đại diện cho các đàn ở mỗi trại thu thập dương tính với virus đậu. Kết quả giải trình tự một phần gen mã hóa protein lõi 4b cho thấy tỷ lệ tương đồng nucleotide giữa 3 chủng virus đậu trong nghiên cứu này dao động từ 99,60-100%. Kết quả phân tích cây phả hệ cũng thể hiện rằng, các chủng virus trong nghiên cứu này cùng thuộc phân nhóm A5 và có mối quan hệ di truyền gần với chủng virus APV_D2 (mã số GenBank MT877437) báo cáo ở Ấn Độ năm 2021 và chủng APV_XL (mã số GenBank KJ192189) ghi nhận ở Trung Quốc năm 2014.

Từ khóa: Virus đậu, Hưng Yên, Ninh Bình, vịt, Polymerase chain reaction.

Detection of Avian Poxvirus in Duck Flocks Raised in Hung Yen and Ninh Binh Province

ABSTRACT

This study aimed to detect the presence of avian poxvirus in ducks raised in Hung Yen and Ninh Binh provinces. Some ducks showing nodular hyperplasia lesions on the beak and around the eyes were discovered in three flocks of ducks raised in the Van Lam district, Hung Yen, and Gia Vien district, Ninh Binh during May - June 2023. Diagnosis using polymerase chain reaction (PCR) method showed that 3 pooled samples taken from suspected infected ducks representing flocks at each collection farm were positive for the viral genome of poxvirus. The results of partial sequencing of the gene encoding core protein 4b showed that the nucleotide similarity between the 3 poxvirus strains in this study ranged from 99.60-100%. The results of phylogenetic tree analysis also revealed that the virus strains in this study belonged to the A5 subgroup and showed a close genetic relationship with the APV_D2 virus strain (GenBank code MT877437) reported in India in 2021 and strain APV_XL (GenBank code KJ192189) recorded in China in 2014.

Keywords: Ducks, Poxvirus, Hung Yen, Ninh Binh, Polymerase chain reaction. Keywords: Ducks, Poxvirus, Hung Yen, Ninh Binh, Polymerase chain reaction.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu gia cầm là một trong những bệnh truyền nhiễm cấp tính ở gia cầm và chim hoang dã ở hầu hết mọi lứa tuổi do virus đậu (Avian Poxvirus - APV) gây ra (Winterfield & Reed, 1985). Virus gây bệnh đậu chủ yếu lây nhiễm cho gà, gà tây và các loài chim trên cạn khác, còn các loài chim nước như vịt và ngỗng ít bị ảnh hưởng hơn (McMullin, 2020).

Gia cầm bị nhiễm virus gây bệnh đậu thường được phân thành HAI nhóm: bệnh bạch cầu và bệnh ngoài da (Zylberberg & cs., 2012). Gia cầm bị bệnh bạch cầu thường có biểu hiện hoại tử fibrin và các tổn thương tăng sinh ở niêm mạc đường hô hấp, miệng và thực quản. Đối với trường hợp bệnh ngoài da, gia cầm có những tổn thương da tăng sinh dạng nốt sần rải rác trên bề mặt không có lông của cơ thể (Van Riper & Forrester, 2007). Bệnh do APV gây ra

có tỷ lệ tử vong thấp nhưng tỷ lệ mắc bệnh cao gây ảnh hưởng đến việc chăn nuôi và tăng trưởng của vật nuôi, gây ra thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi gia cầm nói chung.

Sự xuất hiện của bệnh đậu ở vịt đã được ghi nhận ở đàn vịt nuôi tại Pháp, Ý, Hà Lan, Ấn Độ, Canada, Đức và gần đây nhất ở Trung Quốc cũng ghi nhận thêm những ca đậu ở vịt (Tripathy & cs., 2000; Cui & cs., 2023). Trước đó, chủng APV đã được phân lập từ những vịt và ngỗng có biểu hiện bệnh ngoài da ở Trung Quốc (Zheng & cs., 2015). APV thuộc phân họ *Chordopoxvirinae* thuộc họ *Poxviridae*. Hệ gen của APV là những virus ADN chuỗi kép tương đối lớn (188-360kb), nhân lên trong tế bào chất của các tế bào bị nhiễm virus. Mặc dù APV lây nhiễm cho một số lượng lớn các loài chim và đã có các trình tự hệ gen APV hoàn chỉnh trên ngân hàng dữ liệu GenBank, tuy nhiên, chỉ có 4 loài APV hiện được ICTV (the International Committee on Taxonomy of Viruses, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>) công nhận: (i) chủng APV gây bệnh ở Mỹ (FWPV), (ii) chủng APV ở châu Âu nhược độc (FP9), (iii) chủng virus canarypox độc lực (CNPV), (iv) chủng virus đậu chim bồ câu gây bệnh ở Nam Phi (PGPV) và 5 chủng virus phân lập khác chưa được xác nhận như chủng virus đậu chim cánh cụt, chủng virus thủy đậu gây bệnh ở Hungary, 2 chủng virus gây bệnh đậu mùa và một chủng virus gây bệnh flamigopox (Sarker & cs., 2021).

Cho đến thời điểm hiện tại, ở Việt Nam, chưa có công bố nào ghi nhận APV ở loài thủy cầm. Chính vì vậy, việc lần đầu tiên phát hiện APV ở đàn vịt nuôi tại tỉnh Hưng Yên và Ninh Bình giúp cung cấp thêm thông tin về sự có mặt của APV tại loài thủy cầm chăn nuôi ở nước ta.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu

Đối tượng của nghiên cứu này là APV gây bệnh đậu vịt nuôi tại huyện Văn Lâm (Hưng Yên) và huyện Gia Viễn (Ninh Bình).

Sinh phẩm dùng trong thí nghiệm: Kít tách ADN (Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA

Extraction, iNtRON, Hàn Quốc), kít PCR (GoTag Green Master Mix, Promega, Mỹ), kít tách chiết tinh sạch sản phẩm PCR (QIAquick PCR Purification, QIAgen, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập và xử lý mẫu

Ba mẫu gộp tăng sinh nốt đậu được thu thập thuộc những vịt có biểu hiện xuất hiện nốt đậu tại vùng mỏ và rìa viền mắt tại hai trang trại ở huyện Văn Lâm (Hưng Yên) và một trang trại ở huyện Gia Viễn (Ninh Bình) vào tháng 5-6 năm 2023. Trang trại vịt 4-5 tuần tuổi tại huyện Văn Lâm (Hưng Yên) có quy mô 1.500-3.000 con; trong khi đó, trại vịt ở huyện Gia Viễn (Ninh Bình) có quy mô 2.500 con, những vịt có biểu hiện nốt sần ở 35 ngày tuổi. Mẫu sau đó được bảo quản trong dung dịch phosphate-buffered saline 1X (PBS) và được gửi tới phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh vật Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được đồng nhất với dung dịch PBS1X (Phosphate-Buffered Saline 1X) tỷ lệ 1/10, ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi loại bỏ cặn, 500µl dung dịch trong được bảo quản ở -30°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Chiết tách ADN

ADN trong mẫu nốt sần đã được đồng nhất được chiết tách bằng kít thương mại Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction (Intron, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể: (i) 150µl dịch đồng nhất được trộn đều trong 250µl dung dịch lysis buffer bằng cách vortex đều trong 15 giây. Huyền dịch sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và bổ sung 350µl dung dịch Binding buffer, (ii) toàn bộ hỗn dịch được chuyển sang cột lọc (spin column), (iii) loại bỏ phần dịch bằng cách ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút, (iv) ADN được rửa lần lượt trong 500µl dung dịch Washing A và Washing B, cột lọc được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ toàn bộ phần dung dịch rửa bám trên cột, (v) ADN được hòa tan trong 30µl Elution buffer và được bảo quản ở -30°C cho tới khi sử dụng.

Bảng 1. Thông tin cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự Nucleotide (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
APV1	CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578	Cui & cs. (2023)
APV2	GGCTGCAGCGGTAGCTTA		

2.2.3. Phản ứng polymerase chain reaction (PCR)

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi APV1/APV2 khuếch đại đoạn gen mã hoá protein lõi 4b có độ dài là 578bp (Cui & cs., 2023) để phát hiện APV trong mẫu bệnh phẩm (Bảng 1).

Trong 25µl hỗn dịch phản ứng gồm có 12,5µl GoTag Green Master Mix (Promega, Mỹ), 1µl mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược (10µM) (Bảng 1), 8,5µl nước tinh khiết và 2µl ADN. Phản ứng PCR được thực hiện ở điều kiện 95°C trong 5 phút, 32 chu kỳ gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và hoàn tất phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch 1,5% agarose có bổ sung thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron, Hàn Quốc).

2.2.4. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit thương mại QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Mỹ). Cụ thể: (i) 100µl Buffer PB với 20µl sản phẩm PCR, trộn đều, (ii) toàn bộ hỗn dịch được chuyển sang cột lọc (QIAquick column), (iii) ly tâm hỗn dịch ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút, (iv) loại bỏ dịch, bổ sung 750µl Buffer PE vào cột lọc để rửa ADN, cột lọc được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ toàn bộ phần dung dịch rửa bám trên cột, (v) ly tâm thêm 1 lần cột lọc ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút, (vi) chuyển cột lọc sang ống mới, hòa tan ADN trong 30µl Buffer EB, cột lọc được ly tâm ở 13.000 vòng/phút, thu ADN. Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch được gửi tới Công ty 1st BASE, Singapore để giải trình tự gen.

2.2.5. Phân tích gen và xây dựng cây phả hệ

Trình tự nucleotide căn chỉnh bằng phần mềm Bioedit (Hall, 1999) với công cụ

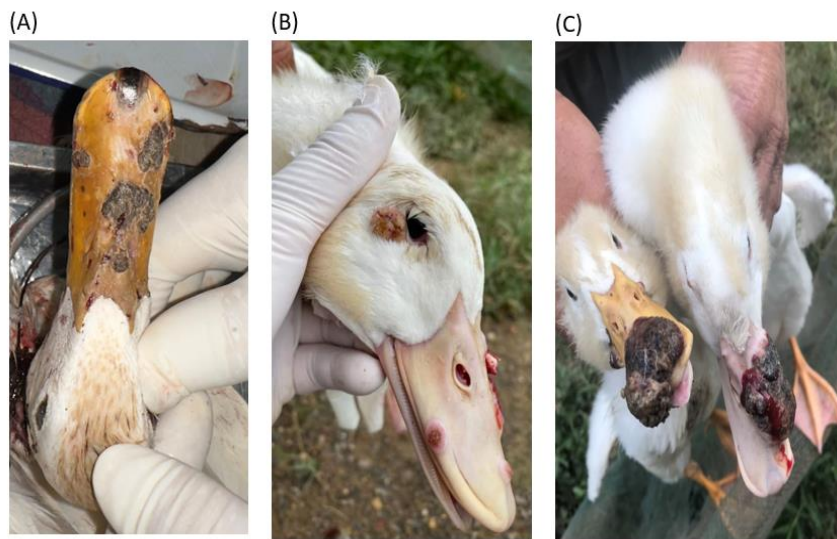
CLUSTAL W (Thompson & cs., 1994). Tỷ lệ tương đồng nucleotide giữa các chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng APV tham chiếu trên ngân hàng GenBank bằng phần mềm GENETYX v.10 (GENETYX Corp., Tokyo, Nhật Bản) và chương trình BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cây phả hệ di truyền được xây dựng dựa trên các trình tự APV thu được trong nghiên cứu này và các trình tự từ GenBank bằng phần mềm MEGA 6 (Tamuar & cs., 2013).

Trình tự chủng APV thu được đã được báo cáo trên ngân hàng dữ liệu GenBank (với mã số GenBank PP536637-PP536639) và sẽ được công bố vào ngày 1/10/2024.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

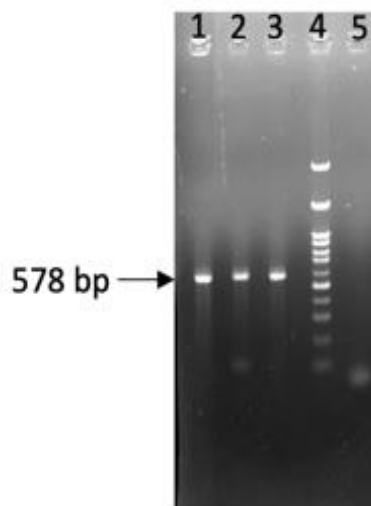
3.1. Một số biểu hiện của vệt nghi mắc bệnh đậu gia cầm

Vào tháng 5-6 năm 2023, một số vệt siêu thịt 4-5 tuần tuổi nuôi tại 02 trang trại thuộc huyện Văn Lâm, Hưng Yên và một trang trại thuộc huyện Gia Viễn, Ninh Bình có biểu hiện các nốt sần ở vùng sừng mỏ và phần quanh viền mắt (Hình 1). Theo quan sát ghi nhận, những vệt này thường chậm vận động, ủ rũ, sau đó ở rìa hốc mắt và rìa mỏ xuất hiện các vảy đậu nổi lên, bề mặt được bao phủ bởi một lớp màng giả màu trắng vàng, rồi dần chuyển sang màu nâu đen. Từ kinh nghiệm chẩn đoán và quá trình nghiên cứu tài liệu, chúng tôi nghi ngờ những vệt có biểu hiện trên mắc bệnh đậu gia cầm do Poxvirus gây ra. Hiện tượng da tăng sản dạng nốt, các vảy đậu và tăng sản dạng nốt xuất hiện rải rác trên bề mặt một số vùng da trên cơ thể như vùng mỏ, vùng rìa mắt, những vùng da ít hoặc không có lông đã được ghi nhận ở những vệt bị bệnh đậu trước đây (Van Riper & Forrester, 2007).



Ghi chú: (A), (B): Vịt có biểu hiện nốt sần thu tại 2 trang trại ở huyện Văn Lâm, Hưng Yên; (C): Vịt có biểu hiện nốt sần tại trang trại ở huyện Gia Viễn, Ninh Bình.

Hình 1. Vịt có biểu hiện nốt đậu tại vùng sừng mỏ được thu thập trong nghiên cứu



Ghi chú: Giếng 1-3: Các mẫu thực địa; Giếng 4: Thang ADN chuẩn 100bp (CSL-MDNA, Cleaver Scientific, Anh); Giếng 5: Mẫu đối chứng chỉ bổ sung nước tinh khiết. Vạch sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 578bp được đánh dấu bằng mũi tên màu đen.

Hình 2. Minh họa kết quả PCR phát hiện APV trong mẫu thu thập

3.2. Kết quả xác định APV bằng phản ứng PCR

Để khẳng định chắc chắn những vịt có biểu hiện trên mắc bệnh đậu gia cầm, chúng tôi đã tiến hành chẩn đoán bằng phản ứng PCR với 3 mẫu gộp bệnh phẩm thu thập được. Kết quả cho thấy, cả 3 mẫu thu thập đều cho sản phẩm PCR khuếch đại chỉ có một vạch duy nhất đối với cặp

mồi APV1/APV2 sử dụng để xác định sự có mặt của APV (578bp), không có vạch sản phẩm PCR phụ; đối với mẫu đối chứng âm không xuất hiện vạch (Hình 2). Kết quả phân tích của chúng tôi phù hợp nghiên cứu của Cui & cs. (2023) khi sử dụng cặp mồi APV1/APV2 để phát hiện APV trên vịt cũng cho kết quả sản phẩm PCR đặc hiệu (587bp).

3.3. Phân tích trình tự gen của một số chủng APV phát hiện ở vịt mắc bệnh

Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và giải trình tự gen với cặp mồi APV1/AVP2. Ba trình tự này được so sánh với dữ liệu gen trên ngân hàng dữ liệu GenBank. Kết quả phân tích đã xác định 3 chủng virus trong nghiên cứu này thuộc nhóm avian poxvirus và được đặt tên là AVP_HY1.23 (với mã số GenBank PP536637), AVP_HY2.23 (với mã số GenBank PP536638) và AVP_NB1.23 (với mã số GenBank PP536639).

Kết quả so sánh trình tự nucleotide giữa các chủng nghiên cứu và các chủng tham chiếu được trình bày ở bảng 2. Khi so sánh trình tự giữa 3 chủng, các chủng virus APV_HY1.23, APV_HY2.23 và APV_NB1.23 có sự tương đồng nucleotide cao, dao động từ 99,60-100%. Cụ thể, 2 chủng APV xác định ở Hưng Yên (AVP_HY1.23 và APV_HY2.23) tương đồng nucleotide 100%, trong khi đó, chủng APV lưu hành ở đàn vịt nuôi tại huyện Gia Viễn, Ninh Bình (APV_NB1.23) có mức tương đồng nucleotide 99,6% với 02 chủng APV lưu hành ở đàn vịt nuôi tại huyện Văn Lâm, Hưng Yên.

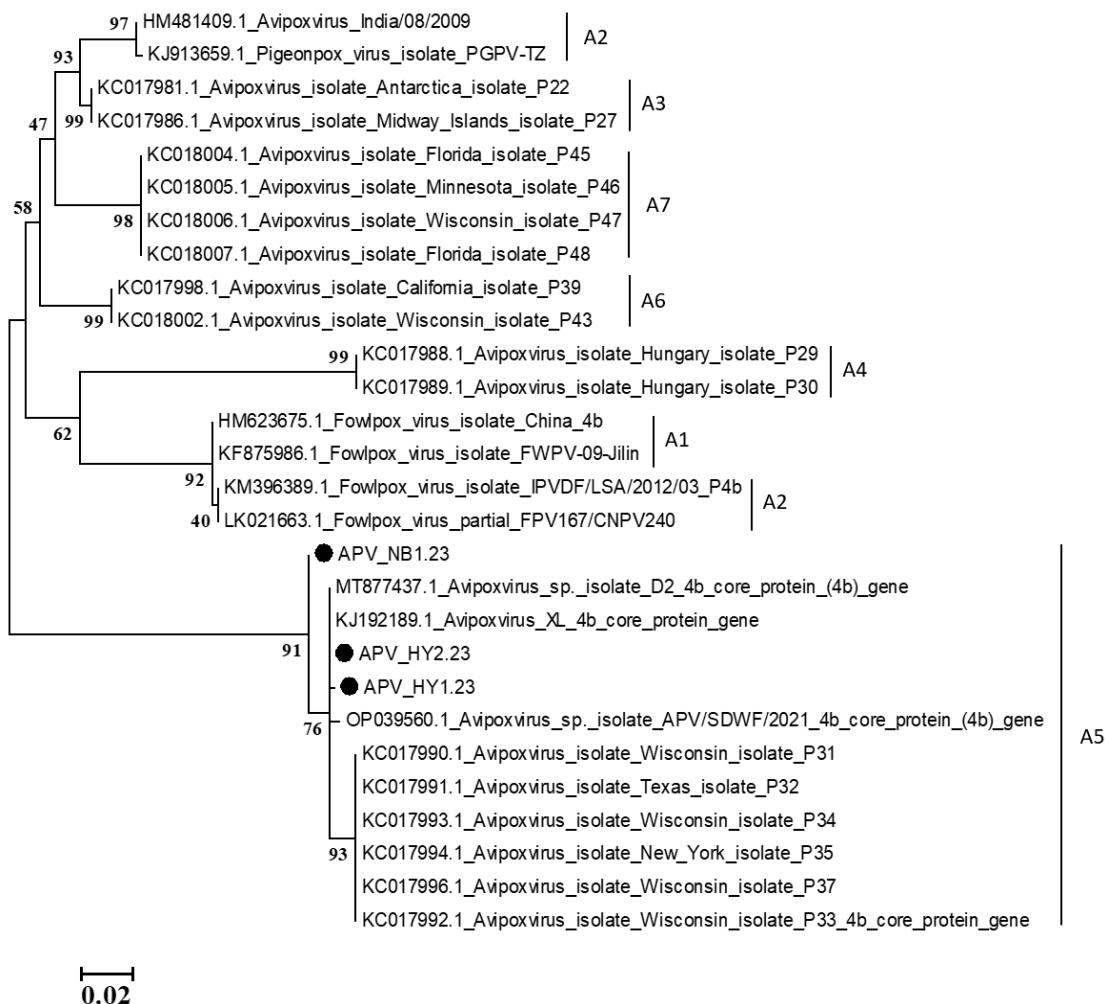
Khi so sánh với các chủng tham chiếu trên ngân hàng GenBank, 02 chủng APV ghi nhận ở Hưng Yên (APV_HY1.23 và APV_HY2.23) có mức độ tương đồng nucleotide cao nhất với chủng APV_D2 (mã số GenBank MT877437) được báo cáo ở Ấn Độ năm 2021 với giá trị lần lượt là 99,81% và 100%. Chủng APV_NB1.23 ở Ninh Bình có mức tương đồng nucleotide cao nhất (99,21%) với chủng APV_XL (mã số GenBank KJ192189) phân lập ở Trung Quốc năm 2014 (Bảng 2).

Protein lõi 4b của chủng APV được ghi nhận là protein cần thiết để xác định các loài virus

đậu ở gia cầm do có khả năng bảo tồn kháng nguyên cao (Gubser & cs., 2004). Chính vì vậy, cây phả hệ đã được xây dựng dựa trên một phần gen mã hoá protein lõi 4b của 3 chủng APV phát hiện được và các chủng APV tham chiếu được lựa chọn đại diện cho 7 phân nhóm A (A1-A7) trên ngân hàng GenBank, nhằm đảm bảo tất cả các vị trí được so sánh của 25 chủng APV đều có nucleotide, các vị trí khuyết nucleotide được xóa bỏ và giữ lại đoạn gen 502 nucleotide. Kết quả thể hiện tại hình 3 cho thấy, 3 chủng APV trong nghiên cứu này đều thuộc phân nhánh A5 và đều có mối quan hệ di truyền với chủng APV được công bố ở Ấn Độ (MT877437) năm 2021 và Trung Quốc (KJ192189) năm 2014. Dựa vào việc phân tích trình tự gen lõi 4b, Binns & cs. (1989) cho biết APV được chia thành 3 dòng, nhóm A (*Fowlpox virus*), nhóm B (*Canarypox virus*) và nhóm C (*Psittacinepox virus*). Theo Hartati & cs. (2021), nhóm A được chia thành 7 phân nhóm: phân nhóm A1 gồm virus thủy đậu, phân nhóm A2 gồm virus đậu gà tây, phân nhóm A3 gồm virus đậu chim biển, phân nhóm A4 gồm virus đậu chim ưng, phân nhóm A5 gồm virus đậu ở thủy cầm, phân nhóm A6 gồm virus đậu bồ câu và phân nhóm A7 gồm virus đậu ở loài chim ăn thịt. Một số nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận chủng APV thuộc phân nhóm A5 ở một số loài thủy cầm hoang dã như vịt trời, thiên nga, vịt đốm, vịt đỏ và mòng két cánh xanh ở Bắc Mỹ (Jarmin & cs., 2006; Gyuranecz & cs., 2013). Tại Trung Quốc, virus ở thủy cầm lần đầu tiên được phân lập từ chim sẻ ở tỉnh Quảng Tây năm 2013, cũng được xác định thuộc phân nhóm A5 (Zheng & cs., 2015). Cui & cs. (2023) đã phân lập chủng virus đậu từ vịt giống nuôi ở thung lũng Cherry bị nhiễm virus đậu gia cầm và khẳng định có mối quan hệ di truyền với các chủng APV thuộc phân nhóm A5.

Bảng 2. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide của gen lõi 4b giữa 03 chủng APV xác định trong nghiên cứu với chủng tham chiếu trên thế giới

Chủng virus	Phân loại	Chủng virus tham chiếu với mức độ tương đồng nucleotide cao nhất			
		Tên chủng	Quốc gia	Mã số GenBank	Tỷ lệ (%)
APV_HY1.23	Avian Poxvirus	D2	Ấn Độ	MT877437	99,81
APV_HY2.23	Avian Poxvirus	D2	Ấn Độ	MT877437	100
APV_NB1.23	Avian Poxvirus	XL	Trung Quốc	KJ192189	99,21



Ghi chú: 03 chủng APV trong nghiên cứu này được thể hiện bằng hình tròn màu đen. Giá trị bootstrap tại các nút (node) của cây phả hệ được hiện thị cho phân nhánh chính.

Hình 3. Cây phả hệ (phylogenetic tree) của APV dựa vào trình tự một phần gen mã hoá protein lõi 4b (502 nucleotide)

Như vậy, kết quả phân tích cây phả hệ đã khẳng định sự hiện diện của chủng APV ở đàn vịt nuôi có bệnh tích đặc trưng của bệnh đậu tại 2 tỉnh Hưng Yên và Ninh Bình. Từ kết quả bước đầu trong nghiên cứu này, việc làm rõ sự lưu hành và vai trò gây bệnh của APV nói riêng và nhóm virus đậu nói chung ở đàn gia cầm nuôi tại Việt Nam là cần thiết.

4. KẾT LUẬN

Sự hiện diện của APV ở 3 trang trại vịt nuôi tại huyện Văn Lâm tỉnh Hưng Yên và huyện

Gia Viễn tỉnh Ninh Bình năm 2023 đặt ra yêu cầu làm rõ về sự lưu hành và vai trò gây bệnh của APV nói riêng và bệnh Đậu nói chung ở đàn thuỷ cầm nuôi tại Việt Nam. Kết quả phân tích một phần gen mã hoá protein lõi 4b của các chủng APV cho thấy, 03 chủng APV trong nghiên cứu này thuộc phân nhóm A5 có độ tương đồng nucleotide cao dao động từ 99,60-100%. Đây là nghiên cứu ban đầu về APV trên thuỷ cầm tại Việt Nam, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung phân tích sâu về mặt di truyền cấp độ phân tử cũng như đặc tính sinh học của APV trên đàn thuỷ cầm ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Binns M.M., Bourns M.E.G., Tomley F.M. & Campbell J. (1989). Analysis of the fowlpoxvirus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology*. 170: 288-291.
- Bolte A.L., Meurer J. & Kaleta E.F. (1999). Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathology*. 28: 415-432.
- Cui Y., Yang J., Wu Q., Zhang H., Liu C., Tang Y. & Diao Y. (2023). Genetic characteristics and pathogenicity of avian pox virus for a new host, Cherry Valley breeder ducks in China. *Avian pathology: Journal of the W.V.P.A.* 52(2): 137-143. <https://doi.org/10.1080/03079457.2022.2159328>.
- Gubsér C., Hué S., Kellam P. & Smith G.L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *The Journal of general virology*. 85 (Pt 1): 105-1117. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19565-0>
- Gyuranecz M., Foster J.T., Dán Á., Ip H.S., Egstad K.F., Parker P.G., Higashiguchi J.M., Skinner M.A., Höfle U., Kreizinger Z., Dorrestein G.M., Solt S., Sós E., Kim Y.J., Uhart M., Pereda A., González-Hein G., Hidalgo H., Blanco J.M. & Erdélyi K. (2013). Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. *Journal of virology*. 87(9): 4938-4951. doi.org/10.1128/JVI.03183-12.
- Hartati S., Untari T., Nuraini A.L. & Nururrozi A. (2021). A case report of outbreak avian pox virus from layer chickens and a pigeon in Yogyakarta, Indonesia. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 9: 1559-1563.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Ser.* 41: 95-98.
- Jarmin S., Manvell R., Gough R.E., Laidlaw S.M. & Skinner M.A. (2006). Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *The Journal of general virology*. 87(Pt 8): 2191-2201. doi.org/10.1099/vir.0.81738-0
- McMullin P.F. (2020). Diseases of poultry. In D.E. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff & G. Zavala (Eds.), *Pox. Diseases of Poultry 14th Edition*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. pp. 364-381.
- Sarler S., Athukorala A., Nyandowe T., Bowden T.R. & Boyle D.B. (2021). Genomic Characterisation of a Novel Avipoxvirus Isolated from an Endangered Northern Royal Albatross (*Diomedea sanfordi*). *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 10(5): 575. doi.org/10.3390/pathogens10050575.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A. & Kumar S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tripathy D.N., Schnitzlein W.M., Morris P.J., Janssen D.L., Zuba J.K., Massey G. & Atkinson C.T. (2000). Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*. 36: 225-230.
- Van Riper C. & Forrester D.J. (2007). Avian Pox. *Infectious Diseases of Wild Birds*, C7. pp. 131-176.
- Winterfield R.W. & Reed W. (1985). Avian pox: infection and immunity with quail, psittacine, fowl, and pigeon pox viruses. *Poultry Science*. 64: 65-70.
- Zheng M., Cao H., Wei X., Qin Y., Ou S., Huang B., He M., Xia Z., Zheng L., Li J. & Liu Q. (2015). Outbreak-associated novel avipoxvirus in domestic mallard ducks, China. *Emerging infectious diseases*. 21(2): 372-373.
- Zylberberg M., Lee K.A., Klasing K.C. & Wikelski M. (2012). Increasing avian pox prevalence varies by species, and with immune function, in Galápagos finches. *Biological Conservation*. 153: 72-79.