

H5N2 低病原性家禽流行性感冒病毒分離株對鴿子與鵪鶉致病性之研究

陳麗璇*、劉玉彬、李敏旭、鄭明珠、洪哲惇、李淑慧
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

利用台灣 2003 年末首次分離到的 H5N2 病毒 (A/chicken/Taiwan/1209/03)，依自然感染途徑，經鼻腔接種鴿子與鵪鶉各 18 隻，每隻接種 $10^{5.16}$ EID₅₀/0.1 mL 病毒液 0.1 mL，並觀察其感受性、體內病毒分佈及抗體消長情形。21 天試驗過程中，鴿子與鵪鶉均無感染症狀，且僅第 2 天及第 3 天的喉拭及肛拭能再度分離出病毒，並以鴿子不具感受性，攻毒後兩天即無法檢測到病毒，且於 21 天試驗期間，抗體均無陽轉現象；至於鵪鶉雖無症狀，但尚有抗體陽轉現象，顯示病毒能進入鵪鶉體內，並引起免疫反應。

關鍵字：H5N2，家禽流行性感冒，致病性，鴿子，鵪鶉

緒言

家禽流行性感冒 (avian influenza, AI) 係由 A 型流行性感冒病毒所引起之全身性或呼吸性疾病，對雞、火雞及鴨等家禽具感染性[2,5,6]；而鴿子在 1987 年首次有報告指出分離到 AI 病毒後，相關研究則陸續指出 H3N6、H3N3、H6N1 及 H9N2 等亞型造成之 AI 感染，但在許多相關的 AI 病毒攻毒試驗研究中卻發現，鴿子的臨床疾病及肉眼或組織病變、排毒及血清抗體陽轉之現象卻非常少[1,4,9]；至於鵪鶉自從 1966 年於義大利首次發生 AI 後，陸續亦在北美、歐洲及亞洲發生疫情。除本身即為具感受性之物種，鵪鶉於 AI 之流行病學亦扮演相當重要的角色[4,7,8,9]。目前已知 AI 病毒若要跨越物種的屏障感染其他動物，絕大部分需經一中間宿主進行基因重組[3]。過往常將可能之中間宿主動物指向為豬，然而在近幾年之文獻中，則提出鵪鶉亦為潛在性的重要中間宿主[4,7,8,9]，並已於 2006 年利用免疫化學染色證實鵪鶉同時具有 SA α 2,3-gal 與

SA α 2,6-gal 受體[10]。1997 年香港在人及家禽分離到之 H5N1 流行性感冒病毒，於分子演化上即與鵪鶉來源之病毒 (quail/Hong Kong/G1/97) 具顯著之相關性。因此為預防家禽流行性感冒之傳播，甚至造成跨越物種之大流行，首先需了解本病之致病機轉。本試驗擬以本土分離到之 AI 病毒對鴿子及鵪鶉進行攻毒試驗以觀察其感受性、體內病毒分佈狀況及抗體消長情形，以助釐清其對於 AI 流行病學所扮演之角色。

材料與方法

病毒來源與定量：使用低病原性家禽流行性感冒 (Low pathogenicity avian influenza, LPAI) 台灣 H5N2 分離株 (A/chicken/Taiwan/1209/03)，以 9~10 日齡雞胚胎蛋之尿囊腔增殖病毒後，進行聚合酶鏈合反應確定無其他病原 (其他亞型 AI、ND、IB、IBD、Mycoplasma 等)，及確定為低病原性後 (切割位之鹼性胺基酸為 REKR/GLF)，進行病毒力價滴

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

定，配置及分裝成 10^6 EID₅₀/0.1 mL 病毒液存放於 -70°C ，預備接種試驗動物。

試驗動物與接種方法：試驗對象動物為國內較主要之禽類鵪鶉(Coturnix)及鴿子(Columba livia)。兩種試驗動物各準備 18 隻，鴿子及鵪鶉來源為乾淨之飼養場，年齡均為四週齡，經確定健康無虞，並採血及採取喉頭氣管和共泄腔拭子後，分別以 HI(Hemagglutination-inhibition)及 PT-PCR 方式檢測確定無 AI 或其他病原感染後，逢機分為三大組：攻毒組 12 隻，同居組 3 隻，對照組 3 隻。攻毒組以點鼻、眼及口方式，每隻均接種 $10^{5.16}$ EID₅₀/0.1 mL 病毒液 0.1 mL，飼養於本所負壓試驗動物舍。同居組不接種，於攻毒後一天關於同一籠子，觀察是否經直接接觸造成感染。每日觀察有無任何症狀。於接種後每日攻毒組及同居組逢機各選取三隻動物採取喉頭氣管拭子和共泄腔拭子，幼小個體禽類不易採集者，則採新鮮排遺取代之。採取之拭子保存於 1 mL 輸送培養液內。輸送培養液係由細胞培養液(minimum essential medium; MEM)或磷酸緩衝液(phosphate buffer saline; PBS)為基礎液，再加 0.5%~1% 牛血清白蛋白或明膠(gelatin)及抗生素。若遇病發瀕死動物，即立刻剖檢取材。攻毒組於第 3 天、6 天及 10 天，各取 3 隻採血犧牲並作剖檢。其餘攻毒組、同居組及對照組動物直至第 21 日時全數採血犧牲並剖檢。對照組則接種 PBS 0.1 mL，飼養於疫學研究組陸禽動物房。

剖檢：犧牲之試驗動物送交本所病理室於負壓解剖房中屍解，觀察有無肉眼病變並進行採樣，採取臟器包括腦，肺臟及氣管，脾臟，腎臟、盲腸扁桃。每種臟器分成二部份，一部份做成乳劑以偵測病毒核酸量及病毒分離，另一部份做病理學檢查。

病毒分離：病材處理：喉頭氣管拭子及共泄腔拭子試管以震盪器混合均勻後靜置備用。組織病材與輸送培養液混合研磨成 10% (W/V) 乳劑，經 1,000g 離心 10 分鐘，取上清液供接種用。處理完成之病材乳劑於室溫中 1~2 小時內儘速接種完成，若放於 4°C 僅能保存數天，否則存放於 -70°C 。

雞胚胎蛋接種：喉頭氣管拭子、共泄腔拭子或組

織乳劑上清液經過濾後，連續 10 倍稀釋到 10^{-6} ，每稀釋倍數接種 0.1 mL 於 8 顆 9~11 日齡雞胚胎蛋的尿囊腔內，以進行病毒定量。接種後，將雞胚胎蛋放在 35°C 恆溫箱中培養 5 天。

收集病毒液：收集病毒液前先將蛋冷卻於 4°C 4 小時或隔夜，待蛋內血管收縮後，抽取尿囊液。經離心 3000 g 5 分鐘去除血球及細胞沉渣，並進行血球凝集試驗檢測病毒之血球凝集性；如果抽取之尿囊液具有血球凝集性，則表示可能有 AI 病毒存在，需進一步鑑定病原並將抽取之尿囊液保存於 -70°C 中。電子顯微鏡觀察：將抽取之尿囊液經負染色後以穿透式電子顯微鏡觀察病毒顆粒的形態。觀察為 AIV 形態後接著進行血清亞型之鑑定。

RT-PCR 鑑定：每個樣本所接種之 SPF 雞胚胎蛋，於 5 日後所收集之尿囊液，均個別進行 RT-PCR 之鑑定，以確認為家禽流行性感冒病毒之增殖。

血球凝集抑制試驗：採血犧牲的試驗動物之待測血清 25 μL 依次作 2 倍稀釋，每孔皆加入 4 個血球凝集單位(HAU)H5 病毒抗原液 25 μL ，在室溫感作 25 分鐘後，每孔加入 1%雞紅血球 50 μL ，振盪 30 秒均勻後，靜置室溫 60 分鐘後判讀。

結果

鴿子於攻毒後第 2 天起開始採喉拭與肛拭，僅第 2 天隨機採樣的 3 隻鴿子有 2 隻肛拭病毒分離陽性(表 1)，但其病毒含量為 $<10^0$ EID₅₀/0.1 mL。而鴿子同居組在於攻毒組接觸後 1 天及 2 天均有 1 隻喉拭為病毒分離陽性，其中第 2 天的喉拭約有 $10^{1.5}$ EID₅₀/0.1 mL。然而攻毒組裡頭第 3 天、第 6 天及第 10 天犧牲後所採取之氣管、肺、脾、腦、盲腸扁桃及腎等臟器均分離不到病毒，血清經血球凝集抑制試驗亦無陽轉現象。所有接種病毒的鴿子均無任何症狀。

鵪鶉於攻毒後第 2 天隨機採樣 3 隻，其喉頭均為病毒分離陽性(表 2)，力價分別為 $10^{2.44}$ 、 10^3 、 $10^{1.44}$ EID₅₀/0.1 mL，第 3 天有 2 隻喉拭病毒分離陽性，力價一為 10^2 EID₅₀/0.1 mL，另一無法計算

力價，同樣地當天所採樣的氣管亦有 1 隻分離到病毒。而血清方面，攻毒後第 6 天及第 10 天 3 隻裡有 2 隻為 H5 抗體陽性，且力價達 16 倍，然而第 21 天僅 1 隻有 2 倍力價。而同居組於同居後第 2 天僅 1 隻喉拭及肛拭分離到病毒，但力價亦僅 $< 10^0 \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ 。所有鵝鵝接種病毒後均無任何症狀。

討論

鴿子於攻毒後第 2 天至試驗結束之 21 天，期間均未能於呼吸道分離到病毒，表示病毒無法於鴿子體內增殖或利用呼吸道進行排毒；攻毒後第 2 天於肛拭檢測出病毒，接下之 20 天則均呈陰性。而自第 3 天、第 6 天及第 10 天所採集的臟器均為陰性，即使是血清 H5 抗體也沒有陽轉的現象，顯示出病毒無法進入鴿子體內，進而無法造成任何病症或甚至是產生 H5 抗體。顯示鴿子對本試驗用之 H5N2 病毒株不具感受性。此情形與國內 2005 年由方等人所作之試驗結果相似[1]。至於同居組雖能由同籠舍飼養之第 1 天及第 2 天時，於呼吸道檢測到病毒，並無法表示接觸感染確實成立。由於試驗過程中，只檢測同居組的喉拭及肛拭，並於第 21 天時犧牲採其血清檢測抗體呈現陰性，試驗過程中沒有定期偵測 H5 抗體，無法得知病毒是否一樣無法進入同居組鴿子的體內，或是曾經有過抗體而於 3 個星期後降低。欲區別這二種可能性，實驗過程中應需定期加測同居組 H5 抗體。

鵝鵝對 H5N2 病毒具較高感受性，於攻毒後第 2 天 3/3 的喉頭拭子均能回收病毒 ($10^{1.44-3} \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$)，及第 3 天時尚有 2/3 喉頭拭子病毒分離陽性 ($10^2 \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ ， $< 10^0 \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$)。在所有臟器裡也只有第 3 天犧牲 3 隻裡的 1 隻鵝鵝氣管有病毒存在，顯示此株弱毒可能對於呼吸道有較高之親和性，此點與 2003 年國外之檢驗結果相吻合[7,8]。攻毒組於第 6 天後血清抗體呈現陽轉，第 6 天及第 10 天均有 2/3 力價達 16 倍，顯示病毒能進入鵝鵝體內，進

而引起免疫反應。然而第 21 天全數犧牲時，鵝鵝攻毒組的抗體不如第 6 天及第 10 天的抗體力價，已降低到僅有 1 隻鵝鵝力價達 2 倍，其餘均為陰性。同居組的鵝鵝於第 21 天時的血清 H5 抗體均為陰性，但曾經有過抗體而後來降低的可能性較高，因此試驗過程中亦應定期加測同居組 H5 抗體。另外，攻毒組的鵝鵝排毒量雖可達 $10^3 \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ ，但僅 1/3 同居組鵝鵝能再次分離出病毒 ($< 10^0 \text{EID}_{50}/0.1 \text{ mL}$)，可能與高架籠飼與流動水源之飼養而造成傳播效率較差。21 天試驗期間，攻毒組鵝鵝雖均未呈現任何臨床症狀，然而綜合以上病毒回收及血清陽轉現象，顯示鵝鵝對本試驗用之 H5N2 病毒株具較高感受性。與 Makarova et al.[7]所做鵝鵝試驗相較，台灣 H5N2 低病原性流感病毒於鵝鵝屬中等增殖能力之病毒，試驗結果亦相似。由於至少 14 種亞型 A 型流行性感冒已證實能在鵝鵝增殖與傳播[7]，鵝鵝亦同時具 SA α 2, 3-gal 與 SA α 2, 6-gal 受體[10]，顯示鵝鵝為潛在性病毒由禽傳人的中間宿主之一，對於家禽流行性感冒病毒之傳播與流行病學上所扮演角色，值得注意。

表 1、鴿子 H5N2 (A/chicken/Taiwan/1209/03) 點鼻試驗之病毒分離結果(陽性數/樣本數)

DPI ^a	攻毒組		同居組		攻毒組臟器						攻毒組血清抗體
	喉拭	肛拭	喉拭	肛拭	氣管	肺臟	脾臟	腦	盲腸扁桃	腎臟	
2	0/3	2/3 ^b	1/3 ^c	0/3	-	-	-	-	-	-	-
3	0/3	0/3	1/3 ^b	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
5	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
7	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
8	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
9	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
10	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
21	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

a：DPI-day post infection

b：檢體病毒力價為 $<10^0$ EID₅₀/0.1 mLc：病毒力價為 $10^{1.5}$ EID₅₀/0.1 mL

表 2、鵝鵝 H5N2 (A/chicken/Taiwan/1209/03) 點鼻試驗之病毒分離結果(陽性數/樣本數)

DPI ^a	攻毒組		同居組		臟器						攻毒組血清抗體
	喉拭	肛拭	喉拭	肛拭	氣管	肺臟	脾臟	腦	盲腸扁桃	腎臟	
2	3/3 ^b	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
3	2/3 ^c	0/3	1/3 ^d	1/3 ^d	1/3 ^d	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
4	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
5	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 ^e
7	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
8	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
9	0/3	0/3	0/3	0/3	-	-	-	-	-	-	-
10	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 ^e
21	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 ^f

a : DPI-day post infection

b : 病毒力價分別為 $10^{2.44}$ 、 10^3 、 $10^{1.44}$ EID₅₀/0.1 mLc : 病毒力價分別為 10^2 EID₅₀/0.1 mL、另一檢體病毒力價為 $<10^0$ EID₅₀/0.1 mLd : 病毒力價為 $<10^0$ EID₅₀/0.1 mL

e : H5 抗體力價為 16 倍

f : H5 抗體力價為 2 倍

參考文獻：

1. Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology* 15;340:70-83. 2005
2. Liu M, Guan Y, Peiris M, He S, Webby RJ, Perez D, Webster RG. The quest of influenza A viruses for new hosts. *Avian Dis* 47(3 Suppl):849-56. 2003
3. Liu M, He S, Walker D, Zhou N, Perez DR, Mo B, Li F, Huang X, Webster RG, Webby RJ. The influenza virus gene pool in a poultry market in South central china. *Virology* 305:267-75. 2003
4. Lu H, Castro AE. Evaluation of the infectivity, length of infection, and immune response of a low-pathogenicity H7N2 avian influenza virus in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* 48:263-70. 2004
5. Manvell RJ, English C, Jorgensen PH, Brown IH. Pathogenesis of H7 influenza A viruses isolated from Ostriches in the homologous Host infected experimentally. *Avian Dis* 47(3 Suppl):1150-3. 2003
6. Makarova NV, Ozaki H, Kida H, Webster RG, Perez DR. Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology* 25;310:8-15. 2003
7. Perez DR, Lim W, Seiler JP, Yi G, Peiris M, Shortridge KF, Webster RG. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens. *J Virol* 77:3148-56. 2003
8. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis* 46:53-63. 2002
9. Tsung-Hsiu Fang, Yi-Yang Lien, Ming-Chu Cheng and Hsiang-Jung Tsai, Resistance of Immune-Suppressed Pigeons to Subtypes H5N2 and H6N1 Low Pathogenic Avian Influenza Virus. *Avian Dis* 50: 269–272. 2006
10. Wan H, Perez DR. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology* 15;346:278-86. 2006

Pathogenesis of H5N2 low pathogenicity avian influenza A virus in pigeons and quails

Chen LH *, Liu YP, Lee MS, Cheng MC, Hong CT, Lee SH

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract In order to evaluate the role of pigeons and quails in the H5N2(LPAI) outbreak from December 2003 to April 2004 in Taiwan, pigeons and quails were inoculated intranasally with the avian influenza virus (031209, A/chicken/Taiwan/1209/03(H5N2)) which was firstly isolated from chickens. In the 21 days experimental period, no clinical sign was observed in pigeons and quails. In quails, virus can be isolated from swabs at 2 and 3 DPI, but no virus from any organs except trachea. Pigeons were resistant to this strain; even there was no seroconversion after virus challenge. Seroconversion was firstly detected at 6 DPI in quails indicating that quails are susceptibility to A/chicken/Taiwan/1209/03(H5N2) as a result of immune response to this strain.

Key word: H5N2, avian influenza, pathogenicity, pigeon, quail

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute