

低病原性家禽流行性感冒病毒 H6N1 亞型感染雞隻之致病機轉

涂央昌*¹、胡書佳¹、鄭益謙²、許偉誠¹、陳彥廷¹、陳麗璇¹

¹ 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

² 國立臺灣大學獸醫專業學院

摘要 本研究利用病理學、免疫組織化學染色及即時定量反轉錄聚合酶鏈反應分析各組織的抗原分佈及病毒含有量，以探討低病原性禽流感 H6N1 亞型病毒 (A/chicken/Taiwan/19120018/2019) 感染雞隻之致病機轉。4 週齡 SPF 雞於經鼻腔接種方式攻毒後第 3、7、10、14 天犧牲並採樣，攻毒雞隻除 1 隻於接種後第 8 天死亡外，其餘均無任何臨床症狀，肉眼病變包含腎臟腫大及全身尿酸鹽沉積僅見於該死亡雞隻，然組織病理學則發現所有攻毒雞隻均有腎小管壞死。免疫組織化學染色發現所有攻毒雞隻在壞死的腎小管上皮均有病毒核蛋白抗原的存在，並且在接種後第 3 天的支氣管上皮亦發現有少量抗原的存在。病毒含有量檢測發現有較高量的病毒存在接種後第 3 及第 7 天的腎臟，接種後第 3 天的喉頭及直腸，及接種後第 3 及第 8 天的華氏囊。口咽及共泄腔的排毒在接種後第 1 天即可檢測到，而口咽的檢出率以接種後第 1 天至第 7 天為最高，共泄腔則為接種後第 3 天，兩者於接種後第 14 天均無檢出病毒核酸。本研究顯示，雞隻腎臟是低病原性禽流感 H6N1 亞型病毒的主要感染器官，而病毒是在腎小管上皮細胞中進行複製。

關鍵詞： 禽流感 H6N1 亞型病毒、致病機轉、腎小管上皮親和性、免疫組織化學染色、病毒含有量

緒言

家禽流行性感冒是由正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*) 之 A 型流行性感冒病毒 (*Influenza virus type A*) 感染所引起，依病毒表面的血球凝集素抗原 (hemagglutinin ; H) 及神經胺酶抗原 (neuraminidase ; N) 可分為許多亞型，感染鳥類的 A 型流行性感冒病毒有 16 種 H 亞型 (H1~H16) 及 9 種 N 亞型 (N1~N9)，依病毒株對雞隻的致病性，可分為低病原性家禽流行性感冒 (low pathogenic avian influenza ; LPAI) 及高病原性家禽流行性感冒 (highly pathogenic avian influenza ; HPAI) 兩種病變型 (pathotype)，目前

只有 H5 和 H7 兩種亞型病毒會對雞、火雞及其他經濟鳥類造成高死亡率，屬於 HPAI，而 LPAI 含有多種任意組合的 H 及 N 亞型，LPAI 通常無明顯臨床症狀且一般也不會死亡，但偶可見呼吸及產蛋下降的症狀 [8, 15]。大部份引起疾病的 LPAI 病毒都有混合感染情形 [2, 7]。

臺灣的 H6N1 亞型病毒自 1972 年就已存在養禽場 [5]，過去研究顯示約 50% 蛋雞以及 30% 肉雞具有該病毒抗體 [5]，自 1997 年後臺灣的 H6N1 亞型病毒自香港與中國東南部的病毒群中獨立演化成單一的本土病毒群 [5]，顯示該病毒經過長時間的演變已在地演化。H6N1 亞型病毒感染雞隻，僅引起輕微的

臨床症狀、產蛋率下降約 33%及每週約 3.8%的死亡率 [13]。臺灣在 2013 年曾發生全球首例人感染 H6N1 亞型禽流感的個案 [14]，其後在 2014 年從犬隻分離出 H6N1 亞型病毒 [6]，這兩例病毒株與禽場的 H6N1 亞型病毒都具有高的同源性 [6, 14]，而某些 H6N1 亞型病毒甚至能跨越物種感染無適應性的小鼠 [5]。

血球凝集素醣蛋白 (HA) 是決定病毒毒力的重要蛋白，禽流感病毒的 HA 會辨認鳥禽類宿主細胞的接受器 sialic acid- α -2,3-galactose，進而結合並感染細胞，當 LPAI 病毒進入細胞後，HA0 的雙硫鍵必須由細胞內的胰蛋白酶 (trypsin-like proteases) 切割形成具功能性的 HA1 與 HA2 蛋白，才會引起感染，而富含胰蛋白酶的呼吸道及消化道上皮則為 LPAI 病毒最常攻擊的組織。反觀，HPAI 病毒由 furin proteases 進行切割，此蛋白酶普遍存在各臟器的細胞中，因此才會導致全身性的感染 [8]。禽流感病毒，最初是在鼻腔的呼吸道上皮進行複製，之後 HPAI 病毒會散佈至全身臟器並引起壞死，而 LPAI 病毒的散佈則以呼吸道及消化道為主 [8]，主要引起鼻炎、竇炎、氣管及支氣管炎的上呼吸道症狀 [8]，少部份會有腎炎及尿酸鹽沉積的病變 [2, 13]。

LPAI 病毒主要侵犯呼吸道及消化道，但在本所蒐集的 H6N1 亞型病毒感染的雞隻病例中，都有發現腎臟的病變，雖然這些 H6N1 亞型病毒的病例普遍都有其他二次性病原的感染，但腎臟經免疫組織化學染色發現病灶中都有病毒抗原的存在，為釐清 H6N1 亞型病毒是否對腎臟具有親和性，本研究以鼻腔接種方式進行攻毒，探討單純的 H6N1 亞型病毒感染是否會引起雞隻的病變及腎臟是否為病毒的親和組織，並利用即時定量反轉錄聚合酶鏈反應探討各組織之病毒含量，以進一步確認 LPAI H6N1 亞型病毒株的腎臟親和性。

材料與方法

病毒備製

本試驗選取 A/chicken/Taiwan/19120018/2019 (H6N1) 接種於 9 - 11 日齡雞胚胎蛋之尿囊腔，於 37°C 培養 2 日後收集該尿囊液，尿囊液經血球凝集

試驗 (hemagglutination assay) 檢測力價為 2^{11} 。後續以分子生物檢測鑑定確認為 H6N1 亞型病毒，以及塗於血液培養基上培養 1 日，確認無雜菌迷入，此尿囊液即後續試驗接種之病毒原液。

將此病毒原液以連續 10 倍稀釋，每稀釋階同樣接種 9 - 11 日齡雞胚胎蛋之尿囊腔，培養 5 日，檢視不同稀釋階雞胚胎蛋的感染情形，並計算雞胚半感染劑量 (50% embryo-infective doses; EID_{50})。本試驗使用之病毒原液之雞胚半感染劑量為 $10^9 EID_{50}/0.1\text{ mL}$ ，於攻毒當日稀釋至 $10^6 EID_{50}/0.1\text{ mL}$ 使用。

實驗設計

本次試驗選用 4 週齡 SPF 雞，共 14 隻，分別為 2 隻對照組及 12 隻實驗組，雞隻以鼻腔接種方式進行攻毒，實驗組注入 0.1 mL 的 H6N1 亞型病毒液，對照組則以無菌生理食鹽水代替。攻毒後連續觀察 14 天並記錄臨床症狀，攻毒後第 1、3、5、7、10、14 天進行口咽拭子及共泄腔拭子採樣，而攻毒後第 3、7、10、14 天分別各犧牲 3 隻進行血清採集及病理剖檢，對照組於最後一天犧牲。

病理學檢查

犧牲或死亡雞隻進行完整解剖及組織採樣，分別採取腦、心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟及消化道等組織，一份冷凍保存於 -20°C ，供分子生物學分析；另一份固定於 10% 中性福馬林，供組織病理學及免疫組織化學染色分析研究。經 10% 中性福馬林固定後的組織經修整、脫水、石蠟包埋及切片，再以蘇木紫 - 伊紅染色供組織病理學判讀。免疫組織化學染色所使用的單株抗體 (WF-4) 是針對 *influenza A virus* nucleoprotein 進行標示，染色方法參考 Tu 等人發表的文獻 [12]。

血清學

攻毒後第 3、7、10、14 天採集之血清以血球凝集抑制試驗 (hemagglutination inhibition test; HI) 檢測 H6 亞型抗體，檢測結果抗體力價 1:16 或以上判為陽性 [1]。

即時定量反轉錄聚合酶鏈反應 (Real- time quantitative reverse- transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR)

口咽拭子及共泄腔拭子以 1 mL 無菌磷酸鹽緩衝液 (Phosphate-buffered saline; PBS) 回溶後取 400 μ L · 使用核酸萃取套組 (MagNA Pure Compact Instrument with MagNA Pure Compact NA Isolation Kit I, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 配合自動化核酸儀 (MagNA Pure Compact Instrument) · 參照產品操作手冊方法萃取病毒核酸。

剖檢雞隻的臟器組織先稱重後 · 再以 10 倍的 PBS 進行研磨及稀釋 · 核酸萃取方式如口咽拭子及共泄腔拭子 · 萃取後的核酸以超微量分光光度計 (Invitrogen Qubit™ 4 Fluorometer) 量測 RNA 的濃度 · 調整樣本 RNA 濃度為 50 ng/ μ L · 取定量的 RNA 核酸濃度進行 qRT-PCR。

以行政院農業委員會公告之「高病原性家禽流行性感冒檢驗方法」中 M 基因 qRT-PCR 進行核酸檢測 [1] · 參考引子對為 M+25F : AGATGAGTCTTCTAA CCGAGGTCG · M-124R : TGCAAAAACATCTTC AAGTCTCTG · 探針序列為 M+64 Probe : FAM-TCA GGCCCCCTCAAAGCCGA-TAMRA [10] · 本次試驗使用 KAPA PROBE FAST Universal One-Step qRT-PCR 試劑 (Roche, Basel, SZ) · 5 μ L 樣本核酸加入 15 μ L 試劑混合液 (其內含有 10 μ M 引子混合液 1 μ L · 10 μ M 探針 0.3 μ L · 2X 試劑 10 μ L · 反轉錄酵素 0.4 μ L 及 DEPC H₂O 3.3 μ L) 進行反應。

依據使用之商品化套組調整 qRT-PCR 的反應條件如下 : 42°C · 20 分鐘 · 95°C · 5 分鐘 ; 95°C · 10 秒 · 60°C · 20 秒 · 共 45 個循環。

各樣本進行二重複檢測 · 使用儀器為 LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH) · threshold 參數測定採用系統自動判讀方式 · 並使用 LightCycler® 480 軟體進行絕對定量 (Absolute Quantitation) 分析。

病毒含有量標準曲線之建立

將已知雞胚半感染劑量的病毒原液稀釋至 10^8

EID₅₀ ~ 10^1 EID₅₀/0.1 mL · 各稀釋階取 200 μ L 病毒液 · 以自動化核酸儀萃取得 50 μ L 核酸 · 各稀釋階核酸與樣本一同進行 M 基因 qRT-PCR · 各稀釋階進行二重複檢測 · 檢測試劑配置及反應條件同樣本。

每一批次即時反轉錄聚合酶鏈反應將依據同一批次反應的各稀釋階病毒液及其所測的相對應 Ct 值 · 建構標準曲線圖 · 將樣本所測之 Ct 值帶入換算其病毒含量。

結果

臨床症狀

實驗組攻毒期間 · 除 1 隻於第 8 天死亡外 · 並未發現任何明顯的症狀 · 飲水及飼料攝量均正常。

肉眼病變

僅於攻毒後第 8 天 (8DPI · Day post-infection) 死亡的雞隻可見腎臟腫至正常的 2 - 3 倍大 · 並可見有灰白色具光澤的結晶樣物質沉積在實質內 · 其餘雞隻則無明顯病變 (表 1 及圖 1)。

組織病變

於攻毒後第 3 天 (3DPI) 可見腎小管上皮呈現多發急性凝固性壞死 ; 於 7DPI 腎小管上皮壞死較 3DPI 嚴重 · 且間質可見淋巴球性腎炎 ; 於 8DPI 的自然死亡雞隻 · 在其肝臟、腎臟、心臟均可見肉芽腫性的壞死病變 · 病變中可見尿酸鹽結晶的沉積 · 腎間質亦可見淋巴球性腎炎 ; 於 10DPI · 除腎小管上皮壞死外 · 間質亦可見淋巴球性的腎炎及纖維化 ; 14DPI 的病變與 10DPI 相同 · 但腎小管上皮可見明顯的再生 (表 1 及圖 1)。

免疫組織化學染色

於 3DPI · 可在支氣管上皮及腎小管上皮偵測到病毒的抗原 ; 而 7DPI · 8DPI · 10DPI · 14DPI 則僅可在腎小管上皮偵測到病毒抗原 · 其中又以 3DPI 的腎小管上皮訊號為最強 (表 1 及圖 1)。

HI 力價

H6 抗體力價在 3DPI 為 0 · 7DPI 為 32 及 256

倍·10DPI 為 128 及 256 倍·14DPI 為 128 倍。

排毒檢測

口咽拭子於攻毒後第 1 (100% · 12/12)、3 (100% · 12/12)、5 (100% · 9/9)、7 (100% · 9/9)、10 (20% · 1/5) 天均可檢測到病毒核酸；共泄腔拭子亦於攻毒後第 1 (16.7% · 2/12)、3 (100% · 12/12)、5 (77.8% · 7/9)、7 (88.9% · 8/9)、10 (80% · 4/5) 天可檢測到病毒核酸。但接種後第 14 天的口咽及共泄腔拭子·則均已檢測不到病毒核酸 (圖 2)。

病毒含有量

實驗組各臟器的病毒含有量 (EID₅₀/mg) 平均值如下 (圖 3)：

3DPI (3 隻平均值)：直腸含量最多·約 8.17E+04·其次為喉頭 1.98E+04、腎臟 1.02E+04、腺胃 1.36E+02。

7DPI (3 隻平均值)：腎臟含量最多·約 6.98E+03·其次為直腸 9.93E+02、華氏囊 8.49E+02、腺胃 2.98E+02。

8DPI (1 隻)：華氏囊含量最多·約 5.25E+03·其次為喉頭 5.88E+02、直腸 2.56E+02、腺胃 2.22E+02。

10DPI (2 隻平均值)：華氏囊仍有少量病毒·約 2.05E+02。

14DPI (3 隻平均值)：華氏囊仍有極少量病毒·約 1.08E+02·腎臟亦可檢測到極少量病毒·約 1.81E+01。

討論

本研究顯示·H6N1 亞型病毒感染雞隻除極少數 (1 隻) 出現死亡·其餘並不會出現明顯的臨床症狀。攻毒雞隻的腎臟均可見腎小管的壞死·除 IHC 染色證實病灶中存在病毒的抗原外·病毒含有量檢測數據亦顯示可在腎臟組織檢出病毒·因此 H6N1 亞型病毒對雞隻腎臟具有高的病原性。

本實驗於攻毒後第 8 天出現 1 隻雞隻死亡·此低致死率的結果與已發表的 H6 亞型病毒感染報告類同

[4, 8, 13]·死亡的雞隻經病理學檢查·推論其死亡原因為腎小管壞死而引起全身尿酸鹽沉積·而 LPAI 病毒感染的雞隻也有類似病變的發生 [4, 8, 9, 13]。

本研究結果顯示·病毒最初是在上呼吸道的上皮進行複製·之後再到腎臟進行增幅·最後經由泌尿道到共泄腔排毒·而感染初期共泄腔的病毒有一部份亦來自上呼吸道。從 IHC 及病毒含有量的結果顯示·所有攻毒雞隻的腎臟均有病毒抗原及病毒核酸的存在·除腎臟外·僅在 3DPI 雞隻的支氣管上皮有發現少量的抗原·反之·消化道上皮在各組均無發現病毒的抗原 (表 1)·而小腸亦僅於 3DPI 有檢測到病毒 (1.8E+02)·其餘各組則均呈陰性·因此共泄腔的病毒應是來自上呼吸道及腎臟·而消化道並非 H6N1 亞型病毒的主要增幅器官。肺臟組織亦不是 H6N1 亞型病毒的感染器官·IHC 結果顯示·僅支氣管的上皮有少量的病毒抗原·而肺臟組織則呈現陰性 (表 1)·肺臟的病毒含有量檢測在 3DPI 有 1.36E+02·而 8DPI (2.31E+00) 及 10DPI (1.57E-01) 的病毒含量則均極低·因此肺臟亦不是 LPAI H6N1 亞型病毒主要的增幅器官。此結果顯示·LPAI H6N1 亞型病毒的特性與其他已知的 LPAI 病毒主要侵犯呼吸道及消化道較為不同 [8]。

腎臟是 H6N1 亞型病毒主要的攻擊及增幅器官·依病理學結果顯示·雞隻在 3DPI 就可見急性腎小管的壞死·8DPI 可能出現有尿酸鹽的沉積·14DPI 可見明顯的腎小管再生·而 IHC 結果顯示在 3DPI 的抗原量最多·之後遞減·而在病毒含有量檢測中·亦以 3DPI (1.02E+04) 最高·7DPI 仍有 6.98E+03·之後急遽遞減 (8DPI 為 3.77E+01、10DPI 為 1.97E+00、14DPI 為 1.81E+01)。病毒在腎小管複製·引起腎小管的壞死·嚴重者會導致腎臟功能衰竭造成尿酸鹽的沉積·此應為單純雞隻感染 H6N1 亞型病毒引起死亡的主要原因·而雞隻的死亡則取決個體狀況·因此死亡率低·但在養禽場內因容易繼發其他病原的感染而可能出現高死亡率 [2, 8, 11]。另外·從 10 及 14DPI 的腎臟病變中可發現壞死的腎小管組織已在進行修復·此顯示雞隻能從感染中復原。

華氏囊亦不是 H6N1 亞型病毒的複製器官·因為雖然病毒含有量檢測在各組均有測到 (3DPI 為

5.66E+03、7DPI 為 8.49E+02、8DPI 為 5.25E+03、10DPI 為 2.05E+02 及 14DPI 為 1.08E+02) · 但 IHC 結果均為陰性 · 故推測華氏囊所存在的病毒核酸可能是由消化道及泌尿道匯集而來 [9]。禽流感病毒被證實會感染華氏囊的上皮細胞 [2, 3] · 亦會造成淋巴細胞流失 · 但不會感染淋巴細胞 [8]。在綠頭鴨人工接種 LPAI H3N8 及 H5N2 亞型病毒的研究中發現 · 在 2 及 3DPI 的華氏囊上皮可見病毒的抗原 [3] · 另一篇在華氏囊上皮發現病毒抗原的研究是雞隻接種 LPAI H9N2 亞型病毒 · 但該報告屬該病毒與其他病原混合感染或合併使用免疫抑制劑的試驗 [2]。因此 · 華氏囊上皮存在病毒抗原可能需要在 3DPI 前觀察或混合其他病原的感染 · 但從本研究的結果顯示 · 雞的華氏囊並不是 H6N1 亞型病毒的主要增幅器官。

雞隻感染 H6N1 亞型病毒僅排毒約 14 天 · 接種後第 14 天的口咽及共泄腔拭子均檢測不出病毒核酸

(圖 2)。口咽拭子至攻毒後第 7 天還能 100% 檢測出病毒核酸 · 但其後就急速下降；共泄腔拭子則僅在攻毒後第 3 天有 100% 病毒核酸檢測出率 · 但第 10 天後就急速下降。H6 的抗體力價除了 3DPI 陰性外 · 其餘各組均有檢測出 · 7DPI 的 H6 抗體力價 32 倍及 256 倍 · 個體間抗體差異較大 · 而 10DPI 則為 128 及 256 倍 · 14DPI 均為 128 倍 · 抗體力價 ≥ 16 倍即表示雞隻有被感染。

本研究顯示 · H6N1 亞型病毒在雞隻體內主要的感染器官為腎臟 · 病毒在腎小管上皮細胞內增殖並引起腎小管上皮的壞死 · 產生的病毒可經泌尿系統排到共泄腔 · 排毒可持續約 14 天 · 單純的 H6N1 亞型病毒感染仍會引起雞隻死亡 · 死因可能係因腎小管壞死 · 腎功能不全引發全身尿酸鹽沉積所致 · 但病毒引起的腎功能衰竭若與其他病原混合感染則有可能會造成禽場的高死亡率情形。

表 1、LPAI H6N1 亞型接種雞隻之肉眼病變、組織病變及免疫組織化學染色結果。

	3 DPI	7 DPI	8 DPI	10 DPI	14 DPI
Gross	NSGL	NSGL	Renal gout	NSGL	NSGL
Histopathology	Acute tubular necrosis	Acute tubular necrosis, interstitial nephritis	Acute tubular necrosis, interstitial nephritis, and systemic gout	Renal tubular necrosis, interstitial nephritis, tubular regeneration, and fibrosis	Renal tubular necrosis, interstitial nephritis, tubular regeneration, and fibrosis
Immunohistochemistry					
kidney	+++	++	++	+	+
bronchi	+	-	-	-	-

IHC reactivity scored as: -, no positivity; +, < 10% positivity/200X; ++, 10 ~ 30 % positivity/200X; +++, > 30% positivity/200X

NSGL: No significant gross lesion.

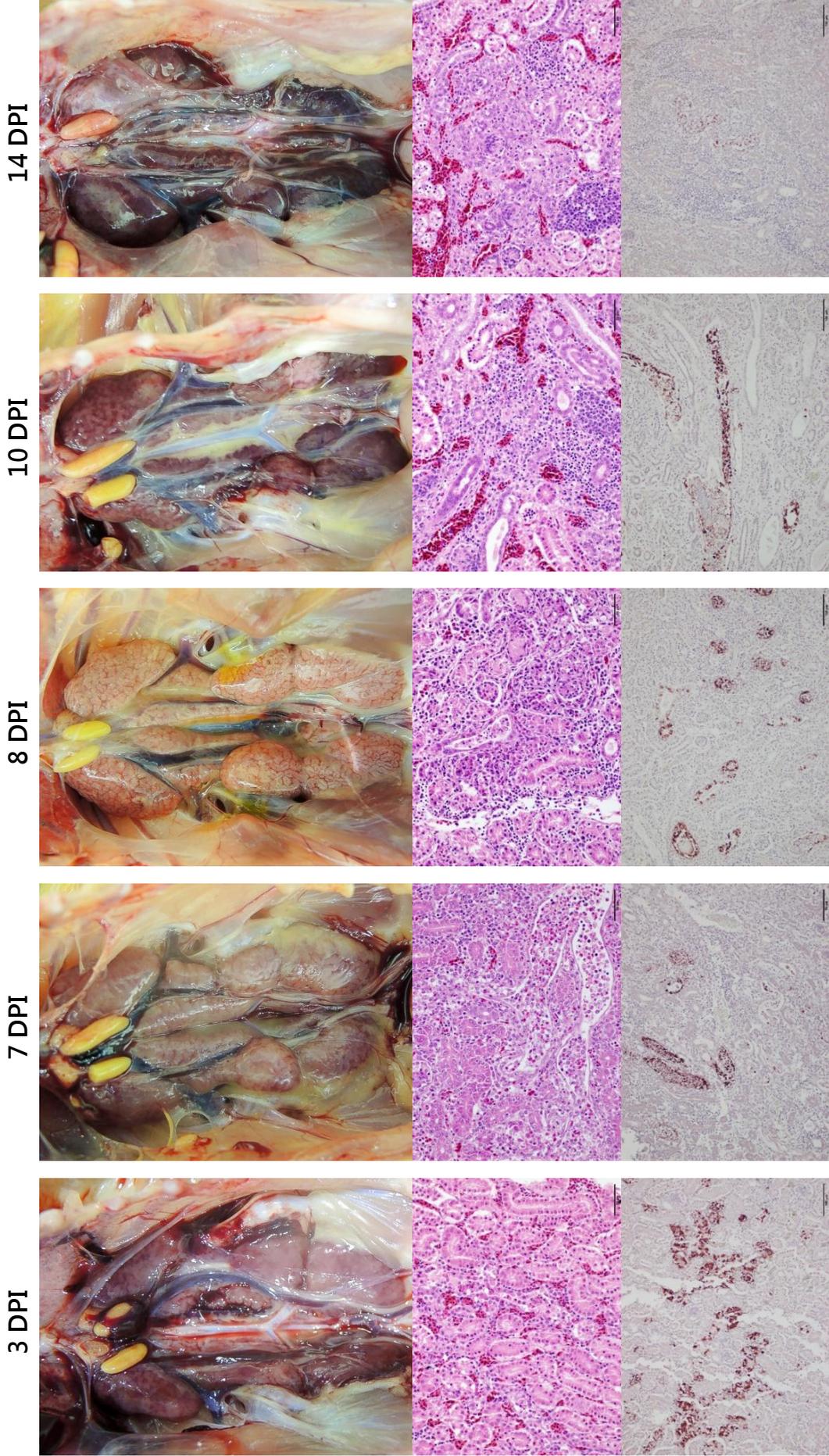


圖 1、LPAI H6N1 亞型病毒接種雞隻之腎臟肉眼病變、組織病變及免疫組織化學染結果。

低病原性家禽流行性感冒病毒 H6N1 亞型感染雞隻之致病機轉

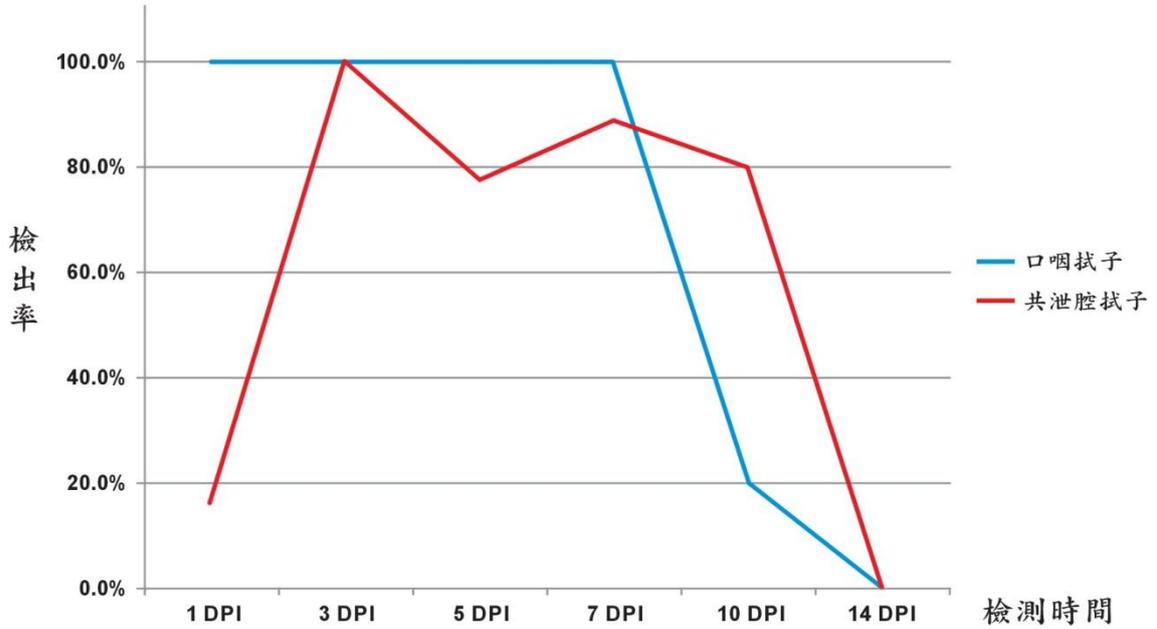
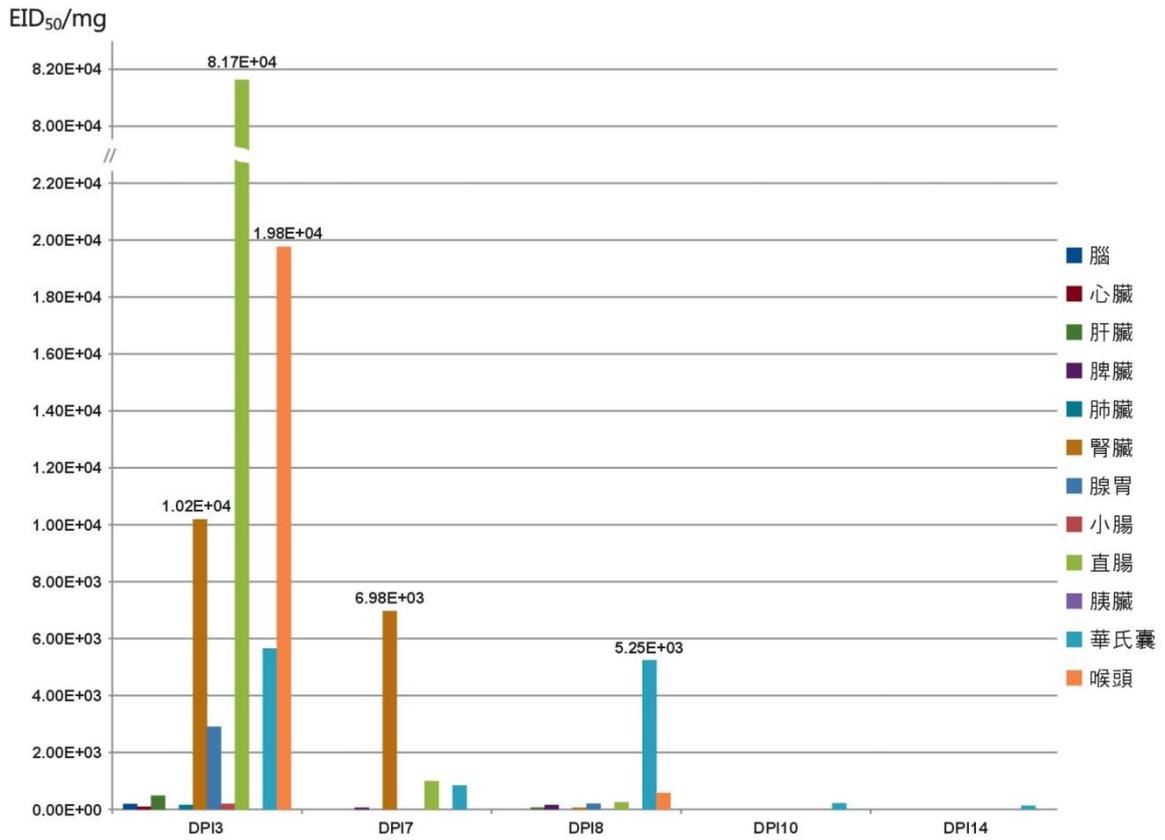


圖 2、LPAI H6N1 亞型病毒口咽及共泄腔拭子之病毒排毒檢測結果。



各臟器的病毒含有量 (EID₅₀/mg) 結果為各組之平均值，
DPI 3、7 及 14 為 3 隻平均值，DPI 10 為 2 隻平均值，DPI 8 僅 1 隻結果。

圖 3、LPAI H6N1 亞型病毒之各試驗組病毒含有量檢測結果。

參考文獻

1. 行政院農業委員會公告-109 年高病原性家禽流行性感冒檢驗方法修正。
2. Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. *Avian Dis.* 47:817-22. 2003. doi: 10.1637/0005-2086-47.s3.817.
3. França M, Stallknecht DE, Poulson R, Brown J, Howerth EW. The pathogenesis of low pathogenic avian influenza in mallards. *Avian Dis.* 56:976-80. 2012. doi: 10.1637/10153-040812-ResNote.1.
4. Kinde H, Read DH, Daft BM, Hammarlund M, Moore J, Uzal F, Mukai J, Woolcock P. The occurrence of avian influenza A subtype H6N2 in commercial layer flocks in Southern California (2000-02): clinicopathologic findings. *Avian Dis.* 47:1214-18. 2003. doi: 10.1637/0005-2086-47.s3.1214.
5. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Chen CL, Shieh HK. Genetic and pathogenic characterization of H6N1 avian influenza viruses isolated in Taiwan between 1972 and 2005. *Avian Dis.* 50:561-71. 2003. doi: 10.1637/7640-050106R.1.
6. Lin HT, Wang CH, Chueh LL, Su BL, Lih-Chiann Wang LC. Influenza A (H6N1) virus in dogs, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 21: 2154-57. 2015. doi: 10.3201/eid2112.141229.
7. Nili H, Asasi K. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Dis.* 47:828-31. 2003. doi: 10.1111/tbed.13944.
8. Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Rev Sci Tech.* 28:113-36. 2009. doi:10.20506/rst.28.1.1869.
9. Slemons RD, Swayne DE. Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.* 34:277-84. 1990. doi: 10.2307/1591409.
10. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 40:3256-60. 2002. doi: 10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002.
11. Stipkovits L, Glavits R, Palfi, Beres A, Egyed L, Denes B, Somogyi M, Szathmary S. Pathologic lesions caused by coinfection of *Mycoplasma gallisepticum* and H3N8 low pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vet Pathol.* 49:273-83. 2012. doi: 10.1177/0300985811415702.
12. Tu YC, Chen KY, Chen CK, Cheng MC, Lee SH, Cheng IC. Novel application of Influenza A virus-inoculated chorioallantoic membrane to characterize a NP-specific monoclonal antibody for immunohistochemistry assaying. *J Vet Sci.* 20:51-7. 2019. doi: 10.4142/jvs.2019.20.1.51.
13. Wang CW, Wang CH. Experimental selection of virus derivatives with variations in virulence from a single low-pathogenicity H6N1 avian influenza virus field isolate. *Avian Dis.* 47: 1416-22. 2003. doi: 10.1637/6093.
14. Wei SH, Yang RJ, Wu HS, Chang MC, Lin JS, Lin CY, Liu YL, Lo YC, Yang CH, Chuang JH, Lin MC, Chung WC, Liao CH, Lee MS, Huang WT, Chen PJ, Liu MT, Chang FY. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med.* 1:771-78. 2013. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70221-2.
15. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). 2021.

Pathogenesis of low pathogenic avian influenza virus subtype H6N1 infection in chickens

YC Tu*¹, SC Hu¹, IC Cheng², WC Hsu¹, YW Chen¹, LH Chen¹

¹Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

²School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

Abstract A study on the pathogenesis of a H6N1 low pathogenic avian influenza (LPAI) virus was carried out in specific-pathogen-free chickens by investigating the gross and microscopic lesions, viral antigen and RNA distribution in tissues, and viral shedding. SPF chickens at the age of 28 days were inoculated intranasally with the LPAI virus of subtype H6N1 (A/chicken/Taiwan/19120018/2019) and sampled on 3, 7, 10, 14 days post-inoculation (DPI). The presence of viral antigen in tissues and viral RNA loads were detected by immunohistochemistry (IHC) and quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR), respectively. Except for a chicken dying on 8 DPI, no clinical signs were observed during the period of this study. Grossly, only the dead chicken displayed lesions of renomegaly and systemic gout. However, renal tubular necrosis was observed in all infected chickens microscopically. By IHC, abundant viral nucleoprotein (NP) antigen was observed in the kidney of all infected groups. NP antigen was also occasionally found in the bronchial epithelial cells on 3 DPI. Higher levels of viral RNA were detected in the kidney by qRT-PCR on 3 and 7 DPI, in the larynx and rectum on 3 DPI, and in the bursa of Fabricius on 3 and 8 DPI. Oropharyngeal and cloacal viral shedding could be detected since 1 DPI, with the highest oropharyngeal shedding rate during the period of 1 to 7 DPI and the highest cloacal shedding rate on 3 DPI. No viral shedding was detected in either site on 14 DPI. The present study demonstrates that kidney is the main target organ of LPAI virus subtype H6N1 in chickens and the virus replicates in the renal tubular epithelial cells.

Keywords: *H6N1 avian influenza virus, Pathogenesis, Renal tubule tropism, Immunohistochemistry, Viral RNA load*

