

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所
碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine
School of Veterinary Medicine
National Taiwan University
Master Thesis

台灣地區鴿子及燕雀目鳥類環狀病毒流行病學研究
Epidemiological Analysis of Circovirus Isolated from
Pigeon and the order Passeriformes in Taiwan



指導教授：蔡向榮 博士
Hsiang-Jung Tsai, Ph. D.

中華民國一〇一年一月
Jan, 2012

致謝

研究所的兩年，特別感謝恩師 蔡向榮教授不厭其煩給予學生論文與實驗上的指導與修正，也非常感謝教授能體諒及包容學生，讓學生能在有限的時間內完成本論文與學業，師恩浩瀚，永銘於心。感謝 蔡信雄老師、沈瑞鴻老師、張紹光老師、周崇熙老師對論文的細心審閱及提供許多寶貴之意見與建議，使本論文更臻完善，謹致上最高敬意。

特別感謝家衛所的長官與同事們，尤其是李淑慧組長的體諒及關照，也非常感謝技輔室同事許聰文研究員、任桓及家慧、忠綺在工作上的分擔及幫忙，非常感謝！

感謝育君學姊與永華學長在實驗上的啟蒙與指導，使我學習許多實驗的方法與技巧，並時常為我解惑，真的非常感謝！也很感謝預防醫學研究室與食品衛生安全研究室的夥伴：建聰學長、鳳綺學姊、揚棋學長、嘉蘭、百勳、怡婷、玉萍、愛萍、瑄珮、嘉元及金玉姊在這兩年的研究生涯中給予的幫助與鼓勵。還要感謝龐飛老師實驗室的俊明學長、李遙學妹及其實驗室同仁在實驗上的幫忙。

感謝同窗琳晶、家慈、昱辰、勳隆、立芸、郁琰、子昇、宗承、為云、瓊瓊、崇崇、唐維、易諺，這兩年的研究所生活中，有你們的陪伴，總是充滿歡笑與溫暖。還要感謝好友士琬、苡珊的鼓勵與支持，希望你們都能幸福快樂。另外，特別感謝郁尊在忙碌的獸醫師工作中抽空教我分析序列及程式的應用，非常感謝！

最後感謝我最愛的爸、媽、老姊和公公婆婆的支持、體諒及鼓勵，讓我能無後顧之憂的完成學業，還有最可愛的寶貝女兒辰洧，聰明懂事又乖巧。當然，支持我最大的幕後功臣非老公百成莫屬了，老公的全力相挺和愛護讓我有勇氣能撐到最後完成學業，真的非常感謝！

感恩這段時間所有幫助過我的你們，讓我能順利完成碩士學業，這份恩情，永記在心！

摘要

鴿子環狀病毒 (Pigeon circovirus, PiCV) 為在年輕鴿群中一新浮現性之疾病，並且被認為是幼鴿症候群 (Young pigeon disease syndrome) 的重要因素之一。而環狀病毒在燕雀目鳥類 (order Passeriformes) 如金絲雀及其他雀科鳥類等所扮演的角色鮮少有報告，目前在台灣燕雀目鳥類為相當常見之鳥種，但並無相關環狀病毒盛行率之報告。此篇研究主要是調查台灣地區鴿子及燕雀目鳥類環狀病毒的盛行率及其親緣性分析，PiCV 檢測部分自 2009-2011 年共蒐集台灣北部及中部共 56 個鴿舍 736 隻賽鴿及 57 隻種鴿之共泄腔拭子與全台 391 隻野鴿之糞便拭子，鴿舍之陽性率為 94.6 % (53/56)，賽鴿及種鴿之檢測陽性率分別為 68.5 % (504/736) 及 38.6 % (22/57)，且 PiCV 陽性率與賽鴿具臨床症狀如下痢、食慾不振、體重下降或飛行表現不佳等呈極顯著之差異 ($p < 0.01$)；而野鴿之檢測陽性率為 31%，且各地區之陽性率差異不大。將部分核酸產物經定序後，與基因庫 (GenBank) 中不同國家之 PiCV 序列比對，ORF V1 之核酸序列及胺基酸序列比對結果相似度為 94.3-99.6% 及 87.1-100 %，而另一個 ORF C1 與基因庫之比對結果相似度分別為 74.2-99.2 % 及 73.2-99.8 %，且此台灣分離株與比利時株較接近，顯示台灣地區之鴿子可能由國外引進不顯性感染 PiCV 之健康鴿，並造成大規模之病毒傳播。另利用原位雜交法可見病毒核酸標記在肝、腎及肺的細胞質中。而在寵物鳥店之鳥類自 2010-2011 年共蒐集 18 場 310 隻鳥類之糞便拭子，寵物鳥店之環狀病毒陽性率為 88.9 % (16/18)，而其環狀病毒盛行率為 54.8 % (170/310)，以燕雀目鳥類之綠繡眼陽性率最高為 91.9 % (102/111)。將 ORF V1 之部分核酸產物經定序後，與基因庫 (GenBank) 之不同鳥種之序列比對，其核酸序列相似性百分比為 61.2-100 %，依其演化的距離及相異度可區分為 4 個分支，分別與 Psittacine beak and feather disease virus (PBFDV), PiCV, Finch circovirus (FiCV) 及 Raven circovirus (RaCV) 較接近；將與 PiCV 分支相近之 ORF C1 與和 GenBank 中不同國家之鴿子環狀病毒分離株核酸序列及胺基酸序列相比，可得相似性百分比為 77.2-99.6 % 及 76.4-100 %，顯示燕雀目鳥類可被跨鳥種之環狀病毒感染的可能性。由此研究可得知，環狀病毒藉由糞便水平傳播在台灣的鴿子及常見的燕雀目鳥類之間有高的盛行率，且由核酸序列、胺基酸序列及親緣性分析可得其病毒來源相當複雜。

關鍵詞： 鴿子環狀病毒、幼鴿症候群、燕雀目鳥類、多引子滾環式增幅法、原位雜交法



Abstract

Circovirus infection is an emerging viral disease of young pigeons and maybe a crucial factor of young pigeon disease syndrome. In addition, little is known about the roles of circoviruses in causing disease in passerine species such as canaries and finches. The order Passeriformes are the most common birds in Taiwan, however there has no relevant studies about the prevalence of circovirus in these species. The aims of this study were to investigate the prevalence and the genetic features of the circovirus strains that infecting the pigeon and birds of the order Passeriformes. In this study, cloacal swabs were collected from 736 racing pigeons and 57 breeder pigeons of 56 lofts in northern and central Taiwan, and also fecal swabs were collected from 391 wild pigeons in Taiwan from 2009-2011. 53 out of 56 lofts were positive and the prevalence of pigeon circovirus (PiCV) were 68.5% (504/736) and 38.6% (22/57), respectively. Racing pigeons with clinical signs such as diarrhea, anorexia, weight loss and poor race performance were related to positive percentage ($p < 0.01$). The prevalence of PiCV in wild pigeons were 31% (121/391) with little difference in 4 areas of Taiwan. PiCVs indicated 94.3-99.6 % and 89.1-100 % of nucleotide and amino acid identity in ORF V1, and ORF C1 sequences were 74.2-99.2 % and 73.2-99.8 %, respectively. Phylogenetic analysis of capsid protein genes of the Taiwanese strains were closely related to Belgian strain, which is probably due to the fact that the PiCV-carrying healthy pigeons introduced from abroad could most likely be the origin of the virus and spread to pigeons in Taiwan. The results of *in situ* hybridization were found mostly in the cytoplasm of infected cells in liver, kidney and lung. Moreover, fecal swabs from 310 birds were collected in pet bird shops in Taiwan from 2010-2011, and the prevalence of circovirus in these birds were 54.8 % (170/310). The highest positive rate was

Zosterops japonicas with 91.9 % (102/111). The ORF V1 sequences revealed these viruses were classified in Psittacine beak and feather disease virus (PBFDV), PiCV, Finch circovirus (FiCV) and Raven circovirus (RaCV). The ORF C1 related to PiCV compared with GenBank indicated 77.2%-99.6% and 76.4-100 % of nucleotide and amino acid identity, which showed the possibility of cross-species transmission of circoviruses among order Passeriformes. The results of this study indicated that the PiCV-positive rate was high in the pigeon and order Passeriformes populations by horizontal transmission of fecal in Taiwan, and according to the sequence diversity and phylogenetic trees indicated the complex sources from nature or others.

Keywords: Pigeon circovirus, young pigeon disease syndrome, order Passeriformes, multiply primed rolling-circle amplification, *in situ* hybridization.



目錄

致謝	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
目錄	VI
圖錄	X
表目錄	XIII
第一章 緒言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 環狀病毒之歷史背景	3
第二節 環狀病毒之分類與特徵	5
2.1 環狀病毒之分類	5
2.2 病毒結構	5
2.3 病毒基因	6
2.4 病毒之物化特性	10
第三節 環狀病毒之致病性	11
3.1 PCV 之致病性	11
3.2 CAV 之致病性	11
3.3 PBFDV 之致病性	12
3.4 PiCV 之致病性	12
3.5 CaCV 之致病性	12
3.6 FiCV 之致病性	13
3.7 RaCV 之致病性	13
第四節 環狀病毒之實驗室診斷	13
4.1 以細胞培養分離病毒	13
4.2 直接觀察病毒	14
4.3 檢測病毒核酸	14

4.3.1	原位雜交法 (<i>In situ</i> hybridization)	14
4.3.2	點漬雜交法 (Dot blot hybridization)	15
4.3.3	聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction)	15
4.3.4	多引子滾環式增幅法 (Multiply primed rolling-circle amplification)	16
4.3.4-1	原理簡介	16
4.3.4-2	RCA 於訊號放大之運用	16
4.4	由血清抗體證實感染	17
4.4.1	免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry)	17
4.4.2	酵素結合免疫吸附法 (ELISA)	18
第五節	環狀病毒之感染控制	18
第六節	環狀病毒之流行病學	19
第七節	幼鴿症候群 (Young pigeon disease syndrome ; YPDS)	21
第三章	材料與方法	23
第一節	試驗材料	23
1.1	鴿子糞便樣本	23
1.2	鴿子病材	24
1.3	寵物鳥店之鳥類糞便樣本	24
1.4	燕雀目鳥類病材	24
1.5	糞便樣本之保存	25
1.6	組織病材均質液之製作及保存	25
第二節	病毒核酸之萃取	26
第三節	聚合酶連鎖反應	26
3.1	引子 (primer) 之選用	26
3.2	聚合酶連鎖反應	28
3.3	巢式聚合酶連鎖反應	28
3.4	瓊脂糖凝膠電泳	29
第四節	多引子滾環式增幅法	29
4.1	鴿子環狀病毒之 Multiply primed RCA	29

4.2	鴿子環狀病毒之限制酶分析	30
第五節	RCA 增幅之 DNA 產物之分子選殖及純化	30
5.1	鴿子環狀病毒之 DNA 產物純化	30
5.2	DNA 接合反應	31
5.3	重組質體之轉型作用	31
5.4	質體 DNA 之抽取	32
5.5	質體 DNA 之限制酶切割確認	33
第六節	核酸序列定序與分析比較及演化分析	33
6.1	核酸序列之定序	33
6.2	病毒核酸序列之分析	34
第七節	原位雜交法 (<i>In situ hybridization</i>)	34
7.1	探針之製備	34
7.2	原位雜交之操作方法	35
第四章	結果	37
第一節	聚合酶連鎖反應檢測結果	37
1.1	鴿子環狀病毒之陽性率	37
1.2	寵物鳥店鳥類環狀病毒之陽性率	39
第二節	環狀病毒之基因分析	40
2.1	核酸序列及胺基酸序列之相似度	40
2.1.1	鴿子環狀病毒 ORF V1 基因	40
2.1.2	鴿子環狀病毒 ORF C1 基因	41
2.1.3	燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF V1 基因	42
2.1.4	燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF C1 基因	43
2.2	環狀病毒親緣樹狀圖	43
2.2.1	鴿子環狀病毒 ORF V1 基因	44
2.2.2	鴿子環狀病毒 ORF C1 基因	44
2.2.3	燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF V1 基因	44
2.2.4	燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF C1 基因	45
第三節	鴿子及燕雀目鳥類病例	46

3.1	聚合酶連鎖反應	46
3.2	原位雜交法 (<i>In situ hybridization</i>)	46
3.2.1	探針製備	46
3.2.2	病毒核酸之偵測	46
第四節	鴿子環狀病毒之質體 DNA	47
第五章	討論	48
第一節	陽性率之討論	48
第二節	診斷方法之討論	51
第三節	基因序列與親緣性分析之討論	53
第六章	參考文獻	77



圖錄

Figure 1. Genome organization of Pigeon circovirus (PiCV).	7
Figure 2. Genome organization of Canary circovirus (CaCV).	8
Figure 3. Genome organization of Finch circovirus (FiCV).	9
Figure 4. Genome organization of Raven circovirus (RaCV).	10
Figure 5. pGEM [®] -T Easy Vector.	57
Figure 6. Polymerase chain reaction analysis of pigeon genome.	57
Figure 7. Polymerase chain reaction analysis of pigeon circovirus (PiCV) ORF V1.	58
Figure 8. Nested broad-spectrum PCR analysis of bird circovirus ORF V1.	58
Figure 9.A. Nucleotide sequences identity and divergence (%) of the ORF V1 genes of PiCV.	59
Figure 9.B. Amino acid sequences identity and divergence (%) of the ORF V1 genes of PiCV.	59
Figure 10. Polymerase chain reaction analysis of pigeon circovirus (PiCV) ORF C1.	60
Figure 11.A. Nucleotide sequences identity and divergence (%) of the ORF C1 genes of PiCV.	61
Figure 11.B. Amino acid sequences identity and divergence (%) of the ORF C1 genes of PiCV.	61
Figure 12. Nucleotide sequences identity and divergence (%) of the ORF V1 genes of circovirus of the order Passeriformes.	62

Figure 13.A. Nucleotide sequences identity and divergence (%) of the ORF C1 genes of circovirus of the order Passeriformes which were closely related to PiCV in wild pigeons. -----	62
Figure 13.B. Amino acid sequences identity and divergence (%) of the ORF C1 genes of circovirus of the order Passeriformes which were closely related to PiCV in wild pigeons. -----	63
Figure 14. Phylogenetic relationship of the ORF V1 genes of PiCV. -----	64
Figure 15. Phylogenetic relationship of the ORF C1 genes of PiCV. -----	65
Figure 16. Phylogenetic relationship of the ORF V1 genes of circovirus of the order Passeriformes. -----	66
Figure 17. Phylogenetic relationship of the ORF C1 genes of circovirus of the order Passeriformes which were closely related to PiCV in wild pigeons. -----	67
Figure 18. PCR detection of the pigeon circovirus (PiCV) in the various tissues and organs of a clinical ill adult pigeon with neurological syndrome. -----	68
Figure 19. Nested broad-spectrum PCR detection of the avian circovirus in the various tissues and organs of two clinically healthy <i>Zosterops japonicus</i> . -----	68
Figure 20. Electrophoresis results of DIG-labeling PCR for PiCV-V1 and Cn probe. -----	69
Figure 21. <i>In situ</i> hybridization for pigeon circovirus (PiCV) DNA in tissues from an adult pigeon with neurological syndrome. -----	70
Figure 22. <i>In situ</i> hybridization for circovirus DNA in tissues from a healthy adult <i>Zosterops japonicus</i> . -----	71

Figure 23. PCR products of the complete circular ssDNA genomes of PiCVs obtained after multiply primed rolling-circle amplification of PiCV and subsequent digestion using *Not* I . -----71

Figure 24. Amplification of PiCV from colonies were cleaved with *Eco*RI to confirm cloning with the correct insert size. -----72



表目錄

Table 1. Summarized information of 14 pigeon circoviruses (PiCVs) used for the sequence comparison in this study. -----	73
Table 2. Summarized information of circovirus of different bird species used for sequence comparison in this study. -----	73
Table 3. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in racing and breeder pigeons in northern and central Taiwan. -----	74
Table 4. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in racing pigeons with/without clinical signs in northern and central Taiwan. -----	75
Table 5. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in wild pigeons in Taiwan. --	75
Table 6. Circovirus PCR-positive rate of different bird species in this study. -----	76
Table 7. All circovirus PCR-positive samples of different bird species in this study were sequenced of ORF V1 and compared with other members of the family <i>Circoviridae</i> . -----	76

第一章 緒言

台灣地狹人稠，但養鴿人口卻相當多，而鴿子總數也突破百萬羽以上，早期飼鴿的風氣起源於新竹、台南、屏東等地區，並開始引進日本等國外的名鴿，幾十年來，賽鴿的體型結構也從大型轉變為中、小型，腳長、頸長、尾長等都縮小，腰腹部更發達，筋肉變得柔軟而富彈性，羽毛綿密，體重變輕，並且鼻瘤眼眶變得較狹小，頭部突出，身體平而低，這些都是鴿種分速增加、耐翔力增強的進步情形。隨著比賽關次的增加，分速的提高，鴿種的進步，無疑的使得競賽更加激烈，加上獎金制的施行，使得投入養鴿的人口大幅增加。但賽鴿的來源相當複雜，自行繁殖、網路拍賣、自國外進口或是專門的賽鴿育種中心等等，增加了許多疾病傳播的機會，而鴿子感染環狀病毒(*pigeon circovirus, PiCV*)，就如同人類感染愛滋病，因為環狀病毒破壞鴿子的免疫系統，使病鴿遭受繼發性如細菌、病毒、原蟲、真菌等感染。此病毒為在年輕鴿群中一新浮現性之疾病，並且被認為是幼鴿症候群的重要因素之一。*PiCV* 屬於環狀病毒科 (*Circoviridae*) 之環狀病毒 (*Circovirus*)，通常感染年輕的鴿子，年齡為 2 個月到 1 歲，雛鴿生長停滯、發育障礙、消化遲緩、羽毛成長不正常而使死亡率增加，1 歲以上成鴿常呈不顯性感染 (Mankertz et al., 2000; Phenix et al., 2001; Todd et al., 2001a)。因 *PiCV* 主要在糞便中偵測到，故推論其傳播途徑以水平方式透過食入或吸入糞便或被糞便汙染的容器或物品而感染，但亦有報告指出可能有垂直傳播之可能 (Soike et al., 2001; Duchatel et al., 2005)。另因過度擁擠、溫度太高、施打疫苗或飛行訓練頻繁等緊迫因子都會誘發此病，且 *PiCV* 對化學及物理的消毒皆具有抵抗性，使得清除不易，對雛鴿及比賽鴿是一大威脅，造成鴿友們經濟上的損失。迄今鳥類的環狀病毒因尚無法利用細胞培養或病毒特異性抗體來偵測病毒抗原，故主要是利用聚合酶連鎖反應及原位雜交法等方式來偵測其病毒 DNA (Smyth et al., 2001; Soike et al., 2001; Hattermann et al., 2002; Todd et al., 2002; Ray et al., 2003; Franciosini et al., 2005)。

燕雀目鳥類如繡眼科的綠繡眼、台灣特有亞種之鶉科的白頭翁、文鳥科的斑文鳥及麻雀等皆為台灣地區常見之留鳥，可在公園、樹林、稻田、果園、闊葉林等地方見到這些鳥類的棲息，在自然界中與其他棲地類型相同之鳥種共存，如烏鴉、野鴿、紅鳩、燕子等，另亦有人為因素之飼養、捕抓或販賣等，使得這些鳥

類被聚集在鳥店的狹窄鳥籠中，和其他鳥種如鸚鵡、畫眉、八哥鳥、文鳥等在同一空間中，而環狀病毒有可能藉由糞便、羽毛或被糞便汙染之器具散播，可能造成不同鳥種間水平感染的機會存在。另外鳥類在野外被捕抓、運送過程、搶食或是被關在狹窄擁擠的鳥籠等人為所引起的緊迫因子，都可能使已有環狀病毒感染之鳥類更容易誘發，而造成免疫抑制使繼發性感染的可能性增加，進而造成鳥類生病、死亡，而使鳥店在經濟上的損失及自然界之失衡。

綜上可見環狀病毒雖不會造成鳥類立即死亡，但因其阻擋鳥隻保護自身疾病的防護，並且阻礙其他疫苗的效力，使其無法產生有效之抗體，故使鳥隻增加對其他疾病的感受性，增加發病率及死亡率。



第二章 文獻探討

第一節 環狀病毒之歷史背景

豬環狀病毒 (porcine circovirus, PCV) 為最早被確認之單股環狀 DNA 病毒，於 1974 年自持續污染隻豬腎細胞株 (porcine kidney cell line, PK-15) 中分離出來 (Tischer et al., 1974)。PCV 共分為兩型，第一型為不具有致病性之 PCV-1。1991 年於加拿大證實另一種類型之 PCV 會引起豬之離乳後多系統消耗性綜合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)，PMWS 的豬隻在臨床上大多出現虛弱、皮膚蒼白、黃疸等症狀，尤其好發於離乳後的豬隻。此兩種 PCV 在抗原性與核酸序列上皆有明顯差異，屬於不同之病毒 (Clark et al., 1997)，因此稱此致病性之 PCV 為 porcine circovirus type 2 (PCV-2)，而不具致病性之 PCV 稱為 porcine circovirus type 1 (PCV-1)，之後於美國、歐洲及亞洲許多國家中皆證實有 PCV-2 存在 (Allen et al., 2000)。

除了 PCV 之外，也陸續發現許多禽鳥類新的環狀病毒，包括雞貧血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) (Gelderblom et al., 1989)、鸚鵡喙羽症病毒 (Psittacine beak and feather disease, PBFDV) (Ritchie et al., 1989) 及鴿子 (Pigeons) (Woods et al., 1993)、金絲雀 (Canaries) (Goldsmith, 1995)、斑鳩 (Senegal doves) (Raidal & Riddoch, 1997)、鵝 (Geese) (Soike et al., 1999)、駝鳥 (Ostrich) (Eisenberg et al., 2003)、鴨 (Ducks) (Hattermann et al., 2003)、七彩文鳥 (Gouldian finch) (Shivaprasad et al., 2004)、烏鴉 (Raven) (Stewart et al., 2006)、歐略鳥 (Starlings) (Johne et al., 2006)、鷗 (Gull) (Todd et al., 2007) 及疣鼻天鵝 (Mute swans) (Halami et al., 2008) 之各種環狀病毒。

鴿子的環狀病毒感染於 1990 年的秋天在美國加州首度發現 (Woods et al., 1993)，為一種新浮現疾病。回溯至 1986 年加拿大及 1989 年澳洲，以穿透式電子顯微鏡觀察鴿子組織，亦發現有類似環狀病毒的包涵體存在 (Woods et al., 1994)，接著在北愛爾蘭 (Smyth & Carroll, 1995)、英格蘭 (Gough & Drury, 1996)、德國 (Soike, 1997) 及比利時 (Duchatel et al., 1998) 等地均陸續有鴿子感染環狀病毒的報告。分子生物學上分析確認了鴿子環狀病毒 (PiCV)、金絲雀環狀病毒 (CaCV)

和鵝環狀病毒 (GoCV) 與鸚鵡喙羽症病毒 (PBFDV) 的關係最為接近 (Mankertz et al., 2000b ; Phenix et al., 2001 ; Todd et al., 2001a)。

環狀病毒在燕雀目鳥類 (order Passeriformes) 如金絲雀及其他雀科鳥類等所扮演的角色較少有報告。Goldsmith 等人在歐洲有好幾年皆有觀察到在初生金絲雀可見黑色斑塊 (black spot)，其特徵包括腹部腫大、膽囊充血及發育不良，並且造成高致病率及高致死率，懷疑與環狀病毒有關(Goldsmith, 1995)。之後在死亡的成年金絲雀有分離到一種類似環狀病毒的感染，此疾病發病極短，僅一到二天即死亡，臨床症狀包括遲鈍、食慾不振、嗜睡及羽毛生長異常。經基因序列分析，此核酸最接近鴿子環狀病毒 (PiCV) 及鸚鵡喙羽症病毒 (PBFDV)，核酸相似度分別為 67.4 % 及 64.9 %，與哺乳動物的環狀病毒 (PCVs) 同源性則為 53.7 % 及 53.9 %，證實為一新型環狀病毒，命名為金絲雀環狀病毒 (Canary circovirus, CaCV) (Phenix et al., 2001 ; Todd et al., 2001b)。

而雀科環狀病毒的感染最早在美國發現約三到六月齡大的斑胸草雀 (Zebra finch, 學名 *Poephila castanotis*) 出現羽毛脫落、肝臟壞死及發現在脾臟淋巴細胞或巨噬細胞內有包涵體的存在 (Mysore et al., 1995)。2004 年 Shivaprasad 等人在一隻 10 週大，有鼻分泌物、呼吸困難、食慾不振及沉鬱等臨床症狀的七彩文鳥中 (Gouldian finch, 學名 *Chloebia gouldiae*) 利用組織病理切片、電子顯微鏡及原位雜交法發現了環狀病毒的感染 (Shivaprasad et al., 2004)。2007 年 Todd 等人在一隻 10 週大七彩文鳥的華氏囊中分離到環狀病毒，經基因序列分析，此核酸和金絲雀環狀病毒 (CaCV) 最接近，核酸相似度為 65.1%，證實為一新型環狀病毒，命名為雀科環狀病毒 (Finch circovirus, FiCV) (Todd et al., 2007)。

另一燕雀目鳥類環狀病毒分離株為在澳洲一隻年輕的野生澳洲渡鴉 (Australian ravens, 學名 *Corvus coronoides*) 羽毛上發現的，其有漸進性發展之羽毛缺陷的病史，羽毛掉色及發育不良等現象，經基因序列分析，此核酸和金絲雀環狀病毒 (CaCV) 與鴿子環狀病毒 (PiCV) 最接近，證實為一新型環狀病毒，命名為渡鴉環狀病毒 (Raven circovirus, RaCV) (Stewart et al., 2006)。

人類具有兩種環狀病毒，1997 年在日本的一個接受輸血後的非 A-G 型肝炎病患血清中，發現一種會感染人類之類環狀病毒，稱為 Torque teno virus (TTV) (Nishizawa et al., 1997)。此病毒之基因體亦為單股、環狀 DNA (Miyata et al., 1999)，

其分類為環狀病毒科下第一個人類環狀病毒 (Mushahwar et al., 1999)。另一種為人類的 TTV-like mini virus (TLMV)，這種病毒除了可自肝炎的病患中檢測出來，亦可在正常的捐血者血液中發現 (Takahashi et al., 2000)。其兩類病毒基因體的組成與 CAV 較為相似，兩者間的差異在 10% 以內 (Islam et al., 2002)。但與其他已知禽類環狀病毒並無相關性，近期的病毒分類已將 TTV 歸類於新的一科中稱為 *Anelloviridae* (Biagini et al., 2007)。

第二節 環狀病毒之分類與特徵

2.1 環狀病毒之分類

環狀病毒科 (*Circoviridae*) 依據其基因組成的不同，共可分為二個病毒屬 (genus)，分別為 *Gyrovirus* 與 *Circovirus*。*Gyrovirus* 中目前僅有雞貧血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 屬於此屬，其基因體為 antisense，CAV 在複製區缺少 nanonucleotide stem loop 的構造，因此被歸至此屬 (Niagro et al., 1998)。*Circovirus* 基因體組成為 ambisense，其成員包含豬環狀病毒第一型 (Porcine circovirus type 1, PCV-1)、豬環狀病毒第二型 (Porcine circovirus type 2, PCV-2)、鴿子環狀病毒 (Pigeon circovirus, PiCV)、金絲雀環狀病毒 (Canary circovirus, CaCV)、鵝環狀病毒 (Goose circovirus, GoCV)、鸚鵡喙羽症環狀病毒 (Psittacine beak and feather disease, PBFDV) 及鴨環狀病毒 (Duck circovirus, DuCV) 等。

2.2 病毒結構

環狀病毒為正二十面體，無封套之單股環形 DNA 病毒，病毒顆粒直徑介於 14 - 26.5 nm 之間。病毒顆粒大小依不同動物而有差異，分別為：CAV 為 19.1-26.5 nm (Gelderblom et al., 1989)、PBFDV 為 14-20.7 nm (Todd et al., 1991)、PiCV 為 14-28 nm (Mankertz et al., 2000)、CaCV 為 16-18 nm (Todd et al., 2001b)、FiCV 為 15-18 nm (Todd et al., 2007) 及 PCV 為 16.5-20.7 nm (Mankertz et al., 1997)。

2.3 病毒基因體

環狀病毒的基因體約 1.7-2.3 kb，不同動物的基因體大小分別為：CAV 為 2298 nt 或 2319 nt (Claessens et al., 1991; Noteborn et al., 1991)、PBF DV 為 1993 nt (Niagro et al., 1998)、PiCV 為 2037 nt (Mankertz et al., 2000)、CaCV 為 1952 nt (Phenix et al., 2001)、FiCV 為 1962 nt (Todd et al., 2007)、GoCV 為 1820 或 1821 nt (Chen et al., 2003)、DuCV 為 1996 nt (Hattermann et al., 2003) 及 PCV-1 為 1759 nt (Meehan et al., 1997)。

PiCV 有五個主要的開放閱讀框 (open reading frame)，分別為病毒基因股 (genomic strand) 之 V1 與互補股 (complementary strand) 之 C1、C2、C3、C4。V1 (nt41-994) 轉譯出與 DNA 複製相關的 Rep 蛋白，C1 (nt. 1987-1166) 轉譯出 29.7 kD 之外殼蛋白 (capsid protein)，C2 (nt. 790-410)、C3 (nt. 292-2036)、C4(nt.984-736)分別轉譯出 13.7、10、8.9 kD 之蛋白 (Daum et al., 2009) (Figure 1)。PiCV 有兩個 intergenic regions，此區域包含有 stem-loop 結構和 nonamer 序列：第一個位在 Cap 與 Rep 的 5'端 (nt.1988-40)，長度為 90 bp，這個片段被認為與 PiCV 之複製起始點有關，其中 20 bp 重複序列可能折疊為 stem-loop，在 stem-loop 結構的頂端有一段序列為 5'-TAGTATTAC 的 nanomer 序列，第二個 intergenic regions 位在 Cap 與 Rep 的 3'端 (nt. 995 - 1167)。分析與比較 GoCV 和 PiCV 的 intergenic regions 分別有 132 nt 和 90 nt，GoCV 的 nonamer 序列在第三個位置是 "T"，而 PiCV、PBF DV、CaCV、PCV-1 和 PCV-2 皆為 "G"，PiCV 的 nonamer 序列與 PBF DV、PCV-1 皆相同，而在 stem-loop 結構上，GoCV 與 PiCV 則分別由 11 個與 20 個鹼基所配對形成 (Todd et al., 2001a)。

分析 PiCV 與其它環狀病毒 V1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 PBF DV (57%)、PCV-1 (41%) 及 PCV-2 (42%)。分析 PiCV 與其它環狀病毒 C1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 PBF DV(39%)、PCV-1(21%)及 PCV-2(23%)。比對全部基因體序列，其相同性則分別為 PBF DV(57%)、PCV-1(36%)及 PCV-2 (34%)。此結果仍以病毒複製蛋白 (Rep) 之保留性為最高 而 PiCV 在演化上最接近 PBF DV (Mankertz et al., 2000)。

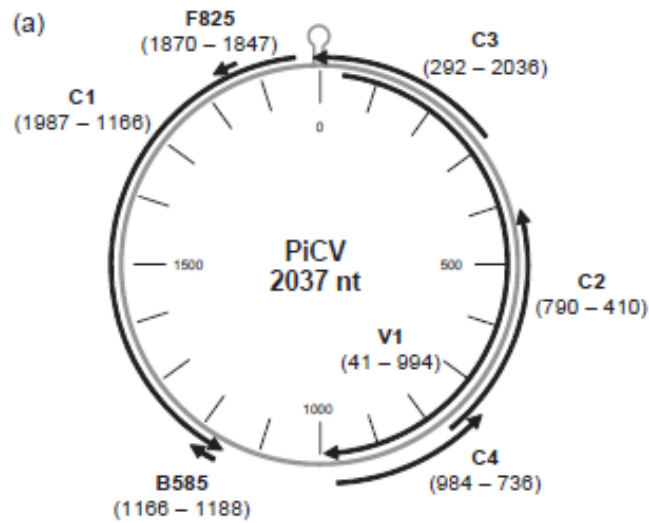


Figure 1. Genome organization of PiCV. Black arrows, transcription of potential ORFs of PiCV, labeled according to their localization on the virus (V) or the complementary (C) strand. Positions of start and stop codons are given by numbers (Daum et al., 2009).

CaCV 有三個主要的開放閱讀框 (open reading frame)，分別為病毒基因股 (genomic strand) 之 V1 與互補股 (complementary strand) 之 C1 與 C2。V1 (nt32-904) 轉譯出與 DNA 複製相關的 Rep 蛋白 33.4 kDa；C1 (nt. 1906-1154) 轉譯出 30 kDa 之外殼蛋白 (capsid protein)，C2 (nt. 679-275) 轉譯出 114.9 kDa 之蛋白，功能不明。CaCV 在 stem-loop 結構有一個推定的 intergenic region，此區域位於 Cap 與 Rep 的 5'端 (nt. 1907-31)，長度為 77 bp，病毒的複製起始點也位於此區，於上之 stem-loop 結構的頂端具有 nonamer 序列為 5'-CAGTATTAC，其第一個位置為 "A"，與 PiCV、PBF DV、GoCV 及 PCV-1 的 "T" 不同 (Meehan et al., 1997,1998；Bassami et al., 1998)。在靠近 stem-loop 結構的尾端，有一段重複兩次的串聯序列為 5'-GGAGCCAC (nt 12-19 and 20-27)，PiCV 也出現相似的情形，在靠近 stem-loop 結構處有一個四次重複的序列為 5'-GGAGCC，推測此種重複序列扮演著病毒複製的角色，可能與環狀病毒 Rep 蛋白結合位有關 (Mankertz et al., 1997, 2000；Niagro et al., 1998；Todd et al., 2001b) (Figure 2)。

分析 CaCV 和其他環狀病毒的基因體序列，其相同性分別為 PiCV (58.3%)、PBF DV (55.7%)、PCV-1 (50.9%) 及 PCV-2 (46.8%)。分析 CaCV 和其他環狀病毒 V1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 PiCV (63.4%)、PBF DV (62.9%)、GoCV

(45.8%)、PCV-1 (42.5%)及 PCV-2 (40.4%)。分析 CaCV 和其他環狀病毒 C1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 PBFDV (44%)、PiCV (39%)、PCV-1 (28.5%)、PCV-2 (29.8%)及 GoCV (25.7%)，故 CaCV 在演化上最接近 PiCV 及 PBFDV (Phenix et al., 2001)。

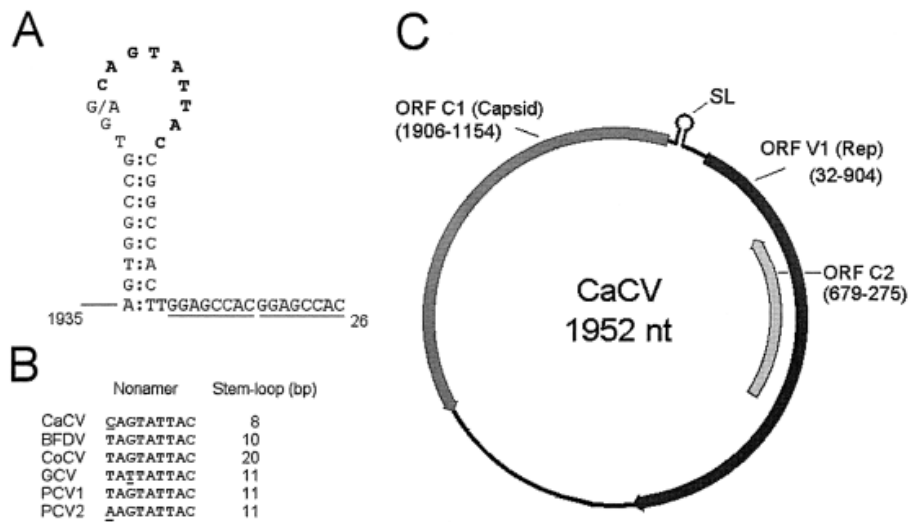


Figure 2. Genome organization of CaCV. (A) Stem-loop sequence present in the CaCV intergenic region. The nonamer element present at the apex of the loop is highlighted in bold ; the tandemly repeated octamer sequence GGAGCCAC is underlined. (B) Relationship between the CaCV nonamer sequence and stem length with those described for other circoviruses. (C) Schematic representation of the circular CaCV genome showing the three major ORFs, V1,C1 and C2. The position of the stem-loop (SL) element within the intergenic region is shown (Phenix et al., 2001).

FiCV 亦有三個主要的開放閱讀框 (open reading frame)，分別為病毒基因股 (genomic strand) 之 V1 與互補股 (complementary strand) 之 C1 與 C2 (Figure 3)。在 stem-loop 結構的頂端有一段為 5'-TAGTATTAC 的 nanomer 序列，與 PCV-1、PBFDV、PiCV 相同。在靠近 stem-loop 結構的尾端，有一段重複兩次的串聯序列為 5'-TGGAACC。而在 Rep 蛋白區域含其他環狀病毒比較有一些被保留的胺基酸序列在 nt 191-223 間，其胺基酸序列包括 WWDGY、DDFYGW 及 DRYP。分析 FiCV 和其他環狀病毒的基因體序列，其相同性分別為 CaCV (65.1%)及 PCV-2

(48.8%)。分析和其他環狀病毒 V1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 CaCV (75.6%)、PiCV (66.9%)、PBFDV (63.2%)、PCV-1 (43.3%)及 PCV-2 (43.0%)。分析 FiCV 和其他環狀病毒 C1 所對應之胺基酸序列，相同性分別為 CaCV (62.5%)、PBFDV (42.3%)、PiCV (40.7%)、PCV-1 (28.0%)及 PCV-2 (29.5%)。故 FiCV 在演化上最接近 CaCV (Todd et al., 2007)。

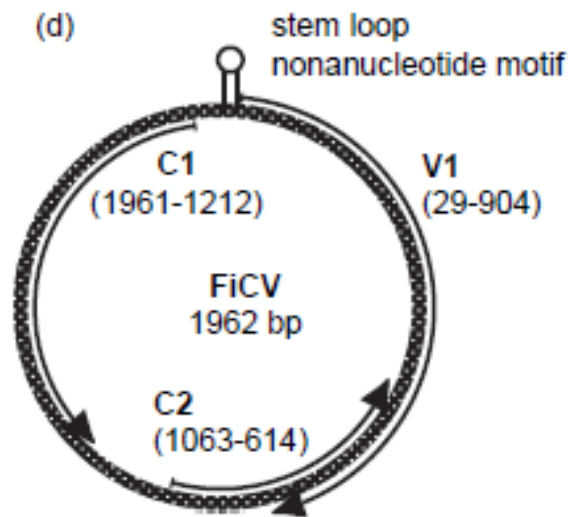


Figure 3. Genome organization of FiCV, showing the locations' major ORFs relative to the potential stem-loop and nonanucleotide motif. The V1 ORF on the virus sense strand encodes the putative replication associated protein (Rep), while the C1 ORF on the complementary sense strand encodes the putative capsid protein. The first and last nucleotides of the ORFs are shown in brackets (Todd et al., 2007).

RaCV 有二個主要的開放閱讀框 (open reading frame)，分別為病毒基因股 (genomic strand) 之 V1 與互補股 (complementary strand) 之 C1，V1 (nt 36-911) 轉譯出與 DNA 複製相關含 291 個胺基酸的 Rep 蛋白；C1 (nt. 1847-1116) 轉譯出含 243 個胺基酸之外殼蛋白 (capsid protein) (Figure 4)。在 stem-loop 結構的頂端有一段為 5'-GAGTATTAC 的 nanomer 序列，其為較保留的部分也和環狀病毒環狀複製的起點有關，而 RaCV nanomer 序列的第一個位置為“G”，和其他環狀病毒的”T”不同。在靠近 stem-loop 結構的尾端，有一段連續的直接與反向的重複序列 5'-CGGCCACTTGGAGCCACGGA-3' 在 nt 3-21 與 nt 1871-1889 位置上。此

外，也有一段重複兩次的串聯序列為 5'-GGAGCCAC-3' 在 nt 12-19 與 nt 20-27 位置上鄰近 stem-loop 結構，此段與 CaCV 之序列相同。分析 RaCV 和其他環狀病毒 C1 所對應之胺基酸序列，相同性分別和 CaCV (69%) 及 PiCV (64-65%) 最接近，而和其他環狀病毒 PBFDV (49-56%)、DuCV (25-27%)、GoCV (25-28%)、PCV-1 (18%) 及 PCV-2 (4%) 差異較多。故 RaCV 在演化上最接近 CaCV 與 PiCV (Stewart et al., 2006)。

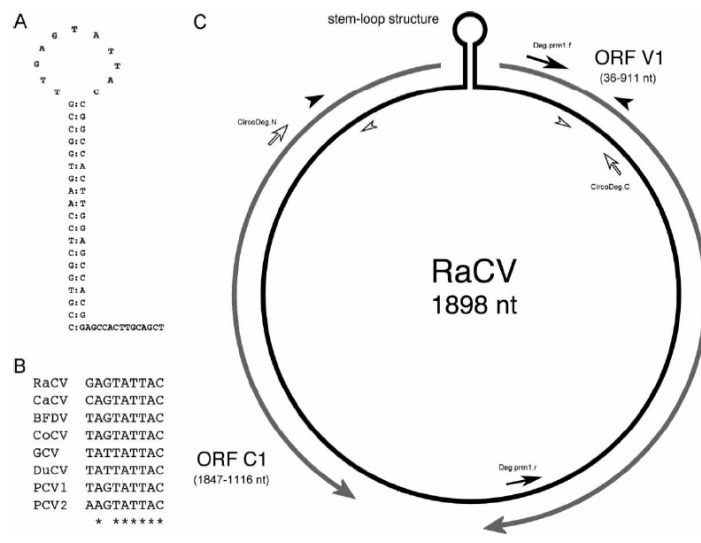


Figure 4. Genome organization of RaCV. (A) The stem-loop sequence present in the RaCV intergenic region demonstrating a nonamer element at the apex of the structure, tandem repeat sequences and nick site. (B) Relationship between the RaCV nonamer sequence in the stem loop with other circoviruses. (C) Schematic representation of the circular RaCV genome indicating the position and length of the two major open reading frames: ORF V1 and ORF C1 (Stewart et al., 2006).

2.4 病毒之物化特性

環狀病毒因其病毒顆粒小，可通過 25 nm 孔徑之濾膜，且對環境之穩定性高。禽類環狀病毒中，CAV 可抵抗氯仿與乙醚，於 80 °C、15 分鐘處理後仍能存活，且於 pH 3 強酸下經 3 小時仍然穩定，且病毒經多次的細胞繼代培養後仍然具有致病力，另使用一般市售的介面活性劑、鹵素類消毒劑等處理之後仍保有其感染

性，而以福馬林薰蒸 24 小時，也只能使 CAV 部分不活化，故 CAV 為一個相當穩定的病毒 (Yuasa, 1992)。PBFDV 於 80 °C、30 分鐘處理後，其凝集紅血球的能力仍存在 (Raidal et al., 1994)。PCV-1 在 72 °C 及 pH 3 的環境下，作用 10 分鐘，或是 60 °C、30 分鐘仍具有抵抗性 (Allan et al., 1994)，而 PiCV 亦同。故推測環狀病毒對環境的抵抗性很高，可相當穩定的存在，故在流行病學及疾病的控制上較為困難 (Todd, 2000)。

第三節 環狀病毒之致病性

3.1 PCV 之致病性

豬隻感染 PCV-1 不會引起任何肉眼及組織病變，但若感染 PCV-2 則會引起豬隻離乳後多系統消耗症候群 (postweaning multisystem wasting syndrome; PMWS)，為一豬隻新興之感染性疾病。主要感染 4-12 週齡之離乳仔豬，隨著豬隻年齡層越高，則具有高 PCV 抗體力價的比率亦隨之增加。臨床症狀包括漸進性消瘦、呼吸困難、咳嗽、黃疸及下痢等。肉眼病變上最常見淋巴節腫大及肉芽腫性間質性肺炎。在組織病變方面，淋巴結的皮質部 (cortex) 淋巴球大量減少，出現肉芽腫性炎症反應，並且有大量組織球浸潤。肺臟可見間質性肺炎、支氣管及細支氣管上皮細胞損傷和肺泡腔內炎症細胞浸潤，亦可見肺泡、肺泡壁、支氣管上皮有嗜鹼性核內及質內包涵體。另外在肝臟、腎臟等其他組織亦可出現肉芽腫性炎症反應。受感染豬隻通常免疫力下降並有繼發性感染的現象 (Allan et al., 1999)。

3.2 CAV 之致病性

CAV 可藉由垂直介卵傳播亦可藉由污染的糞便或雞舍進行水平傳播，會侵犯各年齡層的雞，不過一般認為在雞隻達 2-3 週齡後，感染情形將大幅降低。受感染的雞隻會造成整體性淋巴萎縮、嚴重的貧血及死亡率提高。病毒會分別出現於骨髓與胸腺的紅血球前驅細胞與淋巴前驅細胞，破壞骨髓的紅血球前驅細胞造成嚴重貧血與顆粒球和血小板的流失，而破壞前驅 T 細胞使得成熟的毒殺型與輔助型 T

細胞流失。另外雛雞的 B 細胞對於 CAV 病毒的感染並不具敏感性，且會造成淋巴細胞出現自我凋亡 (apoptosis) 的現象 (Adair, 2000)。CAV 之感染亦可能影響疫苗 (如馬立克病疫苗、新城病疫苗) 效力之減退 (De Bore et al., 1994)。

3.3 PBFDV 之致病性

PBFDV 是野生鸚鵡最常見之病毒性疾病，報告指出 *Agapornis* spp. 和 *Poicephalus robustus* 這兩種鸚鵡的感受性最高 (Heath et al., 2004)。PBFDV 主要造成鸚鵡慢性病變，其症狀包括羽毛脫落及變形、毛囊壞死和喙與爪變形等 (Pass et al., 1984)。剖檢之肉眼病變可見淋巴組織、胸腺及華氏囊萎縮及壞死。組織病理學方面可見發育的羽毛及上皮細胞出現壞死、上皮增生和角化過度等病徵，並可於感染的上皮、毛囊和淋巴組織浸潤的巨噬細胞內見到嗜鹼性質內包涵體的存在。感染 PBFDV 的鸚鵡易發生二次性感染而導致死亡。

3.4 PiCV 之致病性

PiCV 通常感染年輕的鴿子，年齡為 2 個月到 1 歲，1 歲以上常呈不顯性感染。因 PiCV 主要在糞便中偵測到，故推論其傳播途徑以水平方式透過食入或吸入糞便或被糞便汙染的容器或物品而感染，但亦有報告指出可能有垂直傳播之可能 (Sokie et al., 2001 ; Duchatel et al., 2005)。鴿子感染環狀病毒之臨床症狀包括疲倦、食慾減低、體重下降、下痢、呼吸困難、飛行表現不佳等。組織病理學可見在淋巴樣組織、華氏囊、脾臟和胸腺，皆可見有不同程度的淋巴細胞減少，華氏囊之濾泡中的巨噬細胞及華氏囊上皮的細胞內皆可發現葡萄叢狀的質內包涵體。因 PiCV 會誘發免疫抑制，因此感染 PiCV 的鴿子容易受到繼發性的感染，而感染率及致死率則端視鴿子本身的身體狀況、年齡及繼發性感染病原的種類而定 (Roy et al., 2003)。

3.5 CaCV 之致病性

CaCV 在雛鳥及成鳥之金絲雀皆有報告，臨床症狀包括雛鳥可見腹部腫大、膽囊充血及發育不良，成鳥則包括遲鈍、食慾不振、嗜睡及羽毛生長異常。在禽鳥飼養場中造成 10-15 % 的發病率，且約 50 % 的致死率。剖解 4 隻成鳥中有二隻在肌肉可見針點狀出血，其他沒有異狀。而在病鳥的器官均質液中利用電子顯微鏡可見病毒顆粒 (Goldsmith, 1995 ; Todd et al., 2001b)。

3.6 FiCV 之致病性

FiCV 在年輕的雀科鳥類有被報告，其臨床症狀包括鼻分泌物、呼吸困難、食慾不振、沉鬱及羽毛脫落等，而組織病理可見肝臟壞死及發現在脾臟淋巴細胞或巨噬細胞內有包涵體的存在 (Mysore et al., 1995)；電子顯微鏡及原位雜交法可見到環狀病毒 (Shivaprasad et al., 2004)

3.7 RaCV 之致病性

RaCV 在年輕的野生澳洲渡鴉有被報告，其臨床症狀有漸進性羽毛缺損的病史。在組織病理可見不正常的羽毛呈現發展中的濾泡發育不良及在羽髓的某些區域有輕微混合性發炎細胞的浸潤，而雙側性對稱片狀羽毛掉色及發育不良可見明顯的羽鞘變厚、羽髓出血及受感染的羽毛其蘆筆管呈現骨折等，而由病變之羽毛組織萃取 DNA 並增幅之。RaCV 和 PBFDV 在羽毛上的病變很類似，但 RaCV 之臨床症狀不似 PBFDV 會發展成急性或慢性之臨床症狀 (Stewart et al., 2006)。

第四節 環狀病毒之實驗室診斷

4.1 以細胞培養分離病毒

環狀病毒屬中 PCV-1 和 PCV-2 可以在 PK-15 細胞培養中增殖，*Gyrovirus* 病毒屬中 CAV 可以利用 MDCC-MSB1 細胞株或以無特定病原 (SPF) 雞隻進行病毒分離 (McNulty et al., 1991)，但大部分的環狀病毒如 PBFDV、PiCV 和 GoCV 等截

至目前為止皆無法利用細胞培養等 *in vitro* 的方式進行病毒分離及增殖，故無法利用病毒分離來做診斷。

4.2 直接觀察病毒

以電子顯微鏡直接觀察病毒顆粒也是一重要的診斷工具，可對於疾病的感染與否做出快速的確診，但常受限於採樣之病材中所含的病毒顆粒不足或是取樣之病材不適當，而使得其檢出率不高 (McFerran et al., 1978)。在 Soike 等人的研究中顯示有感染 PiCV 的樣材中在電顯的檢測顯示華氏囊的檢出率為最高，可達 90%，接著是胸腺 52% 及脾臟 50%，而其它臟器如腸、肺、氣管、腎、肝或骨髓等則很少見 (Soike et al., 2001)。

4.3 檢測病毒核酸

隨著 cloned DNA 及核苷酸序列分析能力的進步，也可利用原位雜交法 (*in situ* hybridization)、點漬雜交法 (Dot blot hybridization) 及最常用的聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 等檢測方法來進行病毒的診斷 (Smyth et al., 2001; Soike et al., 2001; Hattermann et al., 2002; Todd et al., 2002; Ray et al., 2003; Franciosini et al., 2005)。

4.3.1 原位雜交法 (*in situ* hybridization)

原位雜交技術能在組織切片或完整細胞定位出特殊核苷酸的存在，基於核苷酸探針會與細胞內特異的 DNA 或 RNA 互補結合原理所發展出之技術。早期以放射線同位素標定 DNA 或 RNA 探針，但目前則發展出安全性較高的非放射線物質，如 Biotin、Digoxigenin 及 Fluorescein 來取代。因自然界內源性的 Biotin 廣泛存在，因此限制其發展空間。近年來則較常使用敏感性較高的 Digoxigenin。

而探針的選擇也會影響雜交的特異性及敏感性，不同長度之探針會影響其穿透組織的能力，一般長度約 50-300 個核苷酸較適當。探針種類主要有 DNA 探針 (DNA probe)、RNA 探針 (RNA probe or riboprobe) 及寡核苷酸探針

(Oligonucleotide probe)。DNA 探針的優點為可大量製造、其探針長度大小範圍較廣；RNA 探針其黏附力較強，在 RNA 的偵測背景會較乾淨，但因環境中 RNAs 較多，所以 RNA 探針較不好處理；寡核苷酸探針通常為 15-50 核苷酸，常在序列 3' 端或 5' 端上進行標定，由於此探針較短，所以其敏感性也較高，但常會有非特異性物質鍵結，故須注意探針濃度及有陰性對照組 (McNicol and Farquharson, 1997)。

Soike 等人利用 *in situ* hybridization 診斷華氏囊中 PiCV 之檢出率達 89%，相較於組織病理診斷之 66%，並且利用 ISH 技術也可在其它臟器如肝、腎、氣管、肺、腦、嚔囊、腸、脾、骨髓、心臟等可見受感染之細胞，除了華氏囊外，肝臟也是一個診斷 PiCV 很有效的臟器。雖然由組織病理切片觀察華氏囊的病變為診斷 PiCV 的一項重要工具，再配合 *in situ* hybridization 的敏感性及特異性，使得非淋巴器官的臟器也可偵測出病毒 DNA，可提高檢測率 (Soike et al., 2001)。

4.3.2 點漬雜交法 (Dot blot hybridization)

此法是先利用 PCR 增幅病毒之特異核酸，取其產物點漬於高分子塑膠膜之上並以專一性探針進行反應，細胞或組織中所表現的 DNA 或 RNA 量可以依點印強度來表示。經由此修改過之雜交技術進行診斷，就無需經傳統診斷之病毒分離與培養等步驟。Todd 等人將 32 個樣本利用四種檢測法之檢出率分別為 PCR：84%、*in situ* hybridization：75%、Dot blot hybridization：63% 及組織病理切片：41%，可見 Dot blot hybridization 之敏感性不如 PCR 及 *in situ* hybridization，但仍比組織病理切片檢測敏感，並且在華氏囊內可測到大量之病毒 DNA (10^{13} genome copies/g tissue)，故為一提供病毒半定量之診斷方法 (Todd et al., 2002)。

4.3.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction)

PCR 具有快速且敏感性高等優點，已經被廣泛使用於環狀病毒的研究及診斷技術。可利用已萃取之 DNA 以 DNA 聚合酶進行增幅其病毒序列中某一特定基因片段，用來了解各種基因之序列及研究，並可利用病毒中具有高度保留性及特異性之片段序列作為引子，進行片段之增幅以作為疾病診斷或區分之用，因而為目

前重要的診斷方法 (Todd et al., 2001a)。此法可以偵測到哺乳類與禽類的環狀病毒，故人類之 TTV 與動物之 PCV、CAV、PBFDV、PiCV、CaCV、FiCV 等都有利用 PCR 偵測病毒 DNA 的研究報告 (Nishizawa et al., 1997； Todd et al., 2002； Shivaprasad et al., 2004)。另也有使用巢式聚合酶連鎖反應 (Nested PCR) (Soike et al., 2001； Halami et al., 2008) 及即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) (Duchatel et al., 2009) 等方式進行病毒檢測。

4.3.4 多引子滾環式增幅法 (Multiply primed rolling-circle amplification, RCA)

4.3.4-1 原理簡介

此方法是利用嗜菌體 ($\phi 29$) 的聚合酶能將待測 DNA 環狀模板和逢機寡核苷酸 (random oligonucleotides) 引子間進行鏈取代 (Strand displacement) 的特性，在恆溫下快速擴增成上千個與環狀模版互補之單股 DNA 序列，最後達成訊號放大的結果。

RCA 的第一個步驟為逢機寡核苷酸引子和待測物環狀 DNA 的雜合。第二步驟為加入 $\phi 29$ DNA 聚合酶、 $\phi 29$ DNA 聚合酶 buffer 及 DNA 擴增所需的 dNTPs、無菌二次滅菌水等，並在恆溫中使 DNA 長鏈合成。當 DNA 合成進行到前方引子尾端時， $\phi 29$ DNA 聚合酶便會產生鏈取代特性，將前方 DNA 鏈頂開置換出去，持續地進行 DNA 複製。而被取代置換出來的 DNA 鏈因其序列與初始模版相同，故可再被逢機寡核苷酸引子辨識雜合，進行下一輪的複製動作。有別於 PCR，RCA 的優點為不需要昂貴的溫度循環裝置，只需在 37 °C 恆溫反應下即可進行，並且引子不需特別設計，也不需已知的核酸序列，以限制內切酶消化這些 DNA 產物，再從這些片段的 DNA 去比對為何種病毒的環形核酸即可；但其缺點為待測之 DNA 需為環狀才能進行有效偵測，由於大多植物和動物基因體的 DNA 為線性，因此就不適用 RCA 來進行迅速擴增 (Dean et al., 2001)。Johne 及 Halami 等人也利用此法偵測到新的鳥類環狀病毒 (Johne et al., 2006； Halami et al., 2008)

4.3.4-2 RCA 於訊號放大上之運用

RCA 常被用來進行訊號及核酸標的物 (Target) 序列的擴增，其擴增的方式主要有兩種，一種為線性擴增 (Linear-RCA)，另一種則為指數擴增 (Exponential-RCA)。在線性擴增上，經由環狀 DNA 模板和其對應互補引子間的雜合，在聚合酶鏈式反應作用下，可將 DNA 複製到 10^5 fold 以上，比起原先傳統的菌落基因定序方式，培養菌體時間冗長，RCA 的擴增定序不但省時且操作方便，可說是提供了一個很好的替代；且 RCA 更可利用遠環端和抗體鏈結合後固定於固相表面來偵測特定抗原抗體間的專一性，或是運用在 2-D 或 3-D 的 DNA 微陣列晶片 (Micro arrays) 上以螢光修飾探針雜合擴增大後的標的物序列等。然線性 RCA 的限制為其標的物序列的擴增僅限於環狀 DNA，如環狀病毒、質體或是環狀染色體上，若序列為線性結構則無法有效擴增。指數 RCA 方面，和線性 RCA 類似，差別在於第二逢機引子的使用，利用此雙引子系統在恆溫下，進行指數性的擴增。而指數 RCA 可對非環狀標的物 DNA 進行擴增，透過線狀 DNA 探針兩端鏈結於標的物 DNA 上，經由 DNA 結尾酶結合達成環狀，最後再利用聚合酶進行擴增。因此系統具高度專一性，故可運用在包括將螢光偵測和 RCA 技術結合，去偵測短鏈雙股 DNA，或是將 RCA 運用在蛋白質微陣列生物晶片上以偵測抗原抗體的專一性鏈結等，在生化研究和基因藥理學上都有很多幫助。

4.4 由血清抗體證實感染

4.4.1 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry)

免疫組織化學染色法為在抗體結合螢光或可呈色的化學物質，利用免疫學原理中抗體和抗原間專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原和抗體間專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在。此法不只可用來測知抗原的表現量也可以觀察抗原所表現的位置，此法具有專一性、敏感性、簡便快速及成本低廉，故廣泛使用。目前於 PCV-2、GoCV 皆有報告利用此方法進行環狀病毒的血清學調查及研究 (Racine et al., 2004; Scott et al., 2006)。Abadie 利用 PCV2 之 hyperimmune serum 來進行 PiCV 華氏囊組織之免疫組織化學染色，但因 PiCV 和 PCV2 有不同之抗原性及核酸序列，故無特異性之陽性反應 (Abadie et

al., 2001)。且至目前為止 PiCV 無法使用特定病毒抗血清來偵測病毒抗原，故尚無法適用本法 (Duchatel et al., 2009)。

4.4.2 酵素結合免疫吸附法 (ELISA)

ELISA 是一種具有高度特異性及敏感性的抗原抗體反應，可以檢測微量的抗原或抗體，已被廣泛的應用在醫學及農業。以 ELISA 檢測抗體普遍的應用在各種疾病的診斷，而應用在環狀病毒之診斷上，其敏感性更優於 Immunoperoxidase monolayer assay (Liu et al., 2004)，若以純化之蛋白或是單株抗體，因可提高其敏感性而效果更佳，是用於感染早期之快速診斷，且能同時偵測大批血清。Virus-ELISA 為塗鍍全病毒來偵測環狀病毒抗體，此法較常運用於具有體外培養系統之 PCV2 上 (Nawagitgul et al., 2002)。Indirect-ELISA 為以純化過之病毒顆粒或重組蛋白為抗原來偵測抗體，再利用具有種別特異性之 anti-immunoglobulin enzyme-conjugated Ab 與血清抗體結合，藉由比色反應作為檢測依據，目前多以開發真核表現之重組蛋白之 indirect-ELISA 為主 (Liu et al., 2004；Nawagitgul et al., 2002；Cho et al., 2006)。Daum 等人利用截短的 PiCV capsid protein 在大腸桿菌中過度表現，並在 N-terminus 融合 6 x His-Tag 表現蛋白以進行抗體 His 抗體的偵測，此合適的血清學工具 rCapPiCV-based indirect ELISA 可比單獨只用 PCR 檢測更準確得知 PiCV 在鴿群的感染率，也可在野鴿群中進行系統性的監控，尤其是對不顯性感染但持續排毒的鳥類亦可偵測 (Daum et al., 2009)。

第五節 環狀病毒之感染控制

因環狀病毒對環境的抵抗力很強，且其散播方式又可經由水平傳播，藉糞便及糞便汙染之器具吸入或食入而造成感染，甚或可能經由垂直傳播的方式感染，欲清除或消滅病毒相當困難。疫苗的發展可能為預防環狀病毒感染的方法之一。如在 CAV 為免疫種雞，避免垂直傳播病毒並且使具高感受性的雛雞有高力價的移行抗體，避免感染的發生，分為活毒疫苗與不活化疫苗。活毒疫苗包括野外分離株 (Vielitz & Voss, 1994)、馴化株 (Steenhuisen et al., 1994)，及用遺傳工程技術進行定

位突變之弱毒株 (Noteborn et al., 1998) , 可通過飲水途徑免疫, 對種雞在 13~15 周齡進行免疫接種, 可有效地防止子代發病, 本疫苗不能在產蛋前 3~4 周免疫接種, 以防止通過種蛋傳播病毒; 不活化疫苗包括將全病毒進行不活化 (Pages-Mante et al., 1997), 以及 Baculovirus 表現病毒 VP1 及 VP2 基因所製作之次單位疫苗 (Koch et al., 1995)。

其他禽類環狀病毒的疫苗, 目前只有 PBFDV 有少數之不活化疫苗可供使用, 其他如 PiCV、GoCV、DuCV 尚無開發任何疫苗, 因這些環狀病毒目前皆無法以體外培養系統培養病毒。

PiCV 之致病性及危害性均屬輕微, 鴿子單純感染環狀病毒時不會造成明顯危害, 但如有其他病原混合感染時, 則會導致鴿子發病或死亡。防治鳥禽環狀病毒的措施應包括: 1. 引進無感染環狀病毒之鳥禽: 引進新鳥禽時必須注意其健康狀態, 並管制場外鳥禽之移入, 切勿購入來路不明之鳥禽, 購買鳥禽應慎選防疫措施良好之鳥場, 購入新鳥禽亦需隔離觀察無染病之虞時, 方可與場內動物混養; 2. 已檢驗出呈現陽性之鳥禽需進行隔離飼養: 若經實驗室檢驗呈現陽性之鳥禽, 建議將其與健康鳥禽進行隔離飼養, 避免病毒繼續散播。目前並無針對環狀病毒的特殊治療方式, 也沒有預防性之疫苗可用; 3. 加強飼養管理, 鴿舍平時應確實做好飼養管理, 如保持鴿舍不要接觸外來的鳥禽。另應盡量避免將不同日齡的鳥禽混雜飼養, 且加強統進、統出策略, 方可減少疾病傳播機會, 另應避免過度擁擠、過度的訓練等會造成鳥禽緊迫的行為。注意鳥禽營養之供給, 飼料中添加適量維他命及微量元素, 以提高鳥禽抵抗力。鳥場平時應確實瞭解其所飼養鳥禽之健康狀況, 如發現有疑似疫情發生時, 應檢送病材至獸醫院進行確診, 以釐清病因, 以免造成自身損失; 4. 加強自衛防疫措施, 如鳥禽舍的環境清潔與消毒、病鳥禽隔離及各種疾病預防注射, 以增加疾病抵抗力, 使疾病傷害減至最低。

第六節 環狀病毒之流行病學

豬環狀病毒感染症之為一重要新豬病, 回溯調查發現早於 1969 年比利時、1970 年英國、1973 年愛爾蘭、1985 年加拿大及西班牙的豬隻血清中就存有 PCV2 抗體, 且豬年齡層越高則具有高 PCV 抗體力價的豬隻比率亦隨之增加。依

據 2006 年美國農業部 (U.S. Department of Agriculture, USDA) 報告，保育豬 PCVD 之盛行率為 22.3 %、肥育豬 31.1 %，澳洲為目前唯一無 PMWS 的國家。台灣於 1997 年開始有類似 PCV2 病例報告，2006 年王等利用 PCR 對台灣地區衰弱仔豬進行病毒之檢測，發現約 70-80 % 受到 PCV2 感染，並且這些衰弱仔豬亦有豬巨大病毒 (PCMV)、PRRS virus、Tescho virus、HC 混合感染之現象 (王等，2006)。

而張等於 2009 年進行台灣地區水禽環狀病毒盛行率之調查，收集台中、彰化、雲林、台南、台東等地區之鴨華氏囊檢體 67 件與鵝華氏囊檢體 29 件進行 PCR 檢測，得到 GoCV 或 DuCV 之陽性率分別為 58.6 % 與 58.2 %，此結果與匈牙利鵝環狀病毒之盛行率相似 (王等，2005)。另許等自 2002-2005 年共收集 165 隻鸚鵡分屬於 22 個屬進行 PBFVDV 陽性率調查，發現其檢測陽性率為 41.2 % (許等，2006)。

在鴿子的環狀病毒方面，Todd 等於比利時的 5 個賽鴿舍中採樣 17 隻鴿子，經由 PCR 檢測華氏囊樣本，其中有 16 隻呈陽性，另在北愛爾蘭的 12 個鴿舍中採集 47 個共泄腔拭子進行診斷，其陽性率為 80.9 % (38/47) (Todd et al., 2006)。在 2009 到 2010 年中國東部的 6 個省份共採集了 144 個鴿子的全基因 DNA，其中經 PCR 診斷結果，在不健康的鴿子中其陽性率為 79.8 % (83/104)，而在健康的鴿子其陽性率為 62.5 % (25/40)，總陽性率為 75 % (Zhang et al., 2011)。另外在匈牙利的鴿子環狀病毒盛行率調查中可見鴿舍的陽性率為 93.8 % (15/16)，鴿子的陽性率為 56.9 % (66/116)，顯示此病毒盛行於匈牙利 (Cságola et al., 2011)。而 Schmidt 等依報告可得鴿子環狀病毒感染在歐洲中部已高達 90 % 之盛行率 (Schmidt et al., 2008)。

2005 年 Duchatel 等人在有感染鴿子環狀病毒的鴿舍中，採集 64 隻正在餵飼 1 到 10 天大乳鴿的成鳥的嗉囊拭子，將嗉囊沖洗液進行 PCR 檢測，但皆無陽性反應，推論其病毒經由嗉囊乳汁傳染給幼鴿的機率並不高，另外在 44 個 10-15 天大的鴿子胚胎的組織均質液中經 PCR 檢測有 5 個呈現陽性反應 (Duchatel et al., 2005)。而 Soike 等人在 2 隻鴿子的胚胎中，雖然利用電子顯微鏡沒有觀察到環狀病毒顆粒，但在胚胎中的華氏囊、脾臟、胸腺等利用 PCR 方法有呈現陽性反應，但在尿膜囊並無陽性反應 (Soike et al., 2001)；另在 2006 年 Duchatel 等人除了在 20 隻健康鴿子中利用 PCR 診斷出 13 隻呈現陽性之外，也在 22 個胚胎中診斷出有 8 個呈現陽

性，最常出現在腎臟 (4/8)，接著是華氏囊 (3/8)、肺 (2/8)、肝 (2/8)、脾 (2/8) 及腸 (2/8)，而骨髓及卵黃樣本中皆無發現陽性反應，顯示鴿子環狀病毒有可能經由垂直傳播途徑感染幼鴿，但仍須進一步研究病毒是否可持續存在於生殖組織中或是精子內，亦或者病毒是否可在胚胎中增殖等 (Duchatel et al., 2006)。

第七節 幼鴿症候群 (Young pigeon disease syndrome ; YPDS)

幼鴿症候群 (Young pigeon disease syndrome, YPDS) 又稱為 ” Young bird sickness ” 或 ” Swollen gut syndrome ”，是一種在年輕賽鴿造成高致病率及高致死率的複因子疾病，目前其病因仍不明，主要侵襲 2-6 個月的年輕幼鴿。根據種鴿繁殖場養殖人員觀察到此症候群的現象包括在近二十年內規律的在賽鴿競賽之後開始發病，也可能在施打完疫苗或是新的管理及飛行訓練後好發，另也包括在天氣炎熱時比賽或是過度的擁擠都會誘發此病的發生。臨床症狀並沒有特異性，包括：嗉囊排空速度變慢或是充滿液體、反胃、嘔吐、下痢、體重下降、食慾不振、沉鬱、羽毛雜亂、運動表現不佳或甚至死亡，發病率及死亡率約 20%。在解剖病變中許多病例皆可見嗉囊、前胃及消化器官內充滿綠色液體，早期在實驗室主要分離到的以腺病毒與大腸桿菌為主，稱為 “Adeno coli syndrome”，但在之後的研究中顯示最常分離到的為環狀病毒，而在組織病理切片下可見華氏囊的巨噬細胞及其他器官內如肝臟內可見鹼性多球狀細胞核內及細胞質內包涵體 (Raue et al., 2005 ; Scullion et al., 2007)。

YPDS 被認為是一個複因子疾病，而 PiCV 可能是此病的一個重要因素，因環狀病毒主要侵襲淋巴器官導致免疫抑制現象，進而造成其他細胞及黴菌等的繼發性感染。Schmidt 等人在控制條件下對鴿子進行實驗感染 PiCV 的模式，並從中探討 PiCV 在 YPDS 所扮演的角色，結果顯示雖然在感染組之鴿子有成功感染環狀病毒，但因缺乏讓實驗動物暴露於有壓力的環境，使之無法成功變成 YPDS，這也顯示 YPDS 並非只單靠 PiCV 感染就能誘發此病，故 YPDS 為一複因子之疾病，而 PiCV 只是其中一個因子，還需其他感染因子，尤其是大腸桿菌扮演重要之角色 (Schmidt et al., 2008)。另外 Duchatel 等人亦探究施打商用疫苗是否會誘發 YPDS 的臨床症狀，使之更加嚴重，結果顯示疫苗並未影響 YPDS 感染的病程也沒有引

起 YPDS 的症狀，可能解釋因鴿子都養在室內，在舒適的環境中很少有二次性感染的風險，因此還是要在有壓力的狀態才能誘發 YPDS 的發生 (Duchatel et al., 2010)。而 YPDS 的臨床症狀及死亡率主要端視鴿子是否有繼發性感染。



第三章 材料與方法

第一節 試驗材料

1.1 鴿子糞便樣本

本研究之樣本來源係由台北市及台中市凡賽爾賽鴿寵物鳥醫院之醫師及以北部及中部地區為主之鴿友協助採集之家鴿共泄腔樣本。採樣數之推估係參考歐洲及其他國家之盛行率調查結果，假設台灣地區鴿子環狀病毒之鴿舍預期盛行率為 85% (95% confidence, $\alpha=0.05$, $e=0.1$)，有效樣本應採集 49 個以上之鴿舍，依照地理分布之鴿舍比例計算北部及中部各縣市之鴿舍進行樣本採集，對各年齡層正常或有異狀之種鴿或賽鴿進行逢機採樣。每個鴿舍採樣場數依鴿舍鴿子數目每 50 隻採集 10 個共泄腔拭子樣本，若該鴿舍之鴿子總數少於 50 隻，則仍採集 10 個共泄腔拭子樣本。

自 2010-2011 年共計 2 年，依照地理分布各縣市之採樣鴿舍包括北部分為台北市及新北市 17 場、基隆市 3 場、桃園縣市 3 場、新竹縣市 6 場，中部分為苗栗縣 5 場、台中市 10 場、彰化縣 4 場、雲林縣 7 場及南投縣 1 場，共計 56 個鴿舍。

而依照地理分布各縣市之採樣家鴿數目分別為台北市及新北市賽鴿 171 隻、種鴿 22 隻；基隆市賽鴿 20 隻、種鴿 10 隻；桃園縣市賽鴿 30 隻、種鴿 10 隻；新竹縣市賽鴿 75 隻、種鴿 15 隻；苗栗縣賽鴿 90 隻；台中市賽鴿 145 隻；彰化縣賽鴿 55 隻；南投縣賽鴿 20 隻及雲林縣賽鴿 130 隻，共計北部賽鴿 296 隻、種鴿 57 隻及中部賽鴿 440 隻，總共檢測 793 個家鴿共泄腔拭子樣本。

另由臺灣大學人畜共通傳染病研究中心提供 2009 及 2010 年所蒐集之台北市各地區之野鴿糞便樣本 288 件，及潘銘正教授提供之野鴿糞便樣本 103 件進行檢

驗，共計 391 個野鴿糞便樣材。

1.2 鴿子病材

自台北市動物保護處提供具神經症狀野鴿 4 隻，採集共泄腔拭子、喉頭拭子及血液並進行剖檢，採集腦、氣管、心臟、肺臟、嗉囊、沙囊、腸道、肝臟及腎臟等組織樣本作為檢體。因此 4 隻野鴿皆為成鳥，華氏囊已萎縮消失，故無法採集此臟器。

1.3 寵物鳥店之鳥類糞便樣本

由臺灣大學人畜共通傳染病研究中心提供 2010 及 2011 年間自全台各地寵物鳥店所採集到之鳥類糞便拭子檢體，採樣的寵物鳥店數包括台北市及新北市 7 場，宜蘭縣市 4 場，台中市 4 場，高雄市 1 場，屏東縣 2 場，共計 18 場。

檢體來源鳥類種類及隻數分別為為鸚形目 (order Psittaciformes) 之虎皮鸚鵡 (*Melopsittacus undulatus*) 10 隻及桃面愛情鳥 (*Agapornis roseicollis*) 6 隻、鴿形目 (order Columbiformes) 之紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*) 46 隻，而在燕雀目 (order Passeriformes) 鳥類部分共有 4 種鳥種，分別為綠繡眼 (*Zosterops japonicus*) 111 隻、斑文鳥 (*Lonchura punctulata*) 34 隻、白頭翁 (*Pycnonotus sinensis*) 83 隻及麻雀 (*Passer montanus*) 20 隻，總檢測隻數為 310 隻。

1.4 燕雀目鳥類病材

自台北市三興鳥店購買已為成鳥、外觀正常之綠繡眼，共計 2 隻，採集共泄腔拭子經 PCR 檢測皆呈陽性反應，並進行後續解剖採集腦、氣管、心臟、肺臟、嗉

囊、腸道、脾臟、肝臟及腎臟等臟器、進行各臟器之 PCR 檢測及組織切片之原位雜交反應等。因此 2 隻綠繡眼已為成鳥，華氏囊已萎縮消失，故無法採集此臟器。

1.5 糞便樣本之保存

將鴿子及燕雀目鳥類之共泄腔或糞便樣本以棉棒拭子採集後，插入 2 mL 含 gelatin 運輸培養液試管內，快速扭轉棉棒以便盡量除去棉頭的液體，然後將拭子丟棄，並放置於 4 °C 冰箱保存檢體。Gelatin 運輸液之製備係參照行政院農業委員會動植物防疫檢疫局「高病原性家禽流行性感冒檢驗方法」之規定，即將磷酸緩衝液(PBS) 1L 當成基礎液，再與 gelatin 5 g 混合，高溫高壓滅菌後，待回溫到室溫後加入抗生素 penicillin (1×10^7 U/L)、streptomycin (200 mg/L)、gentamicin (250 mg/L)、polymyxin B (2×10^6 IU/L)，具有保護病毒及抑制細菌之功效，製備完成後於 4 °C 冰箱保存。

1.6 組織病材均質液之製作及保存

將採取之組織病材約 300-500 mg 在無菌操作台中以滅菌剪刀剪碎，之後放入無核酸酶陶珠 (ceramic spheres bead) (Roche, Germany)之反應管中，並加入 1 mL TPB (Tryptose Phosphate Broth) (BD, France)，再放入陶珠型組織均質機 (MagNA Lyser System) (Roche, Germany)中，將檢體快速磨碎後，以 4°C 7000 xg 離心 5 分鐘，收集上清液存於-20°C 冰箱保存。

第二節 病毒核酸之萃取

使用 DNAzol Reagent (Invitrogen, USA)進行 DNA 之萃取。其步驟如下: 先將含鴿子或寵物鳥店之鳥類糞便拭子、血液及組織病材均質液等樣本混合均勻，抽取 100 μ L 上清液加入 1 mL DNAzol 溶液，於 1.5 mL 微量試管混合均勻後，在室溫中靜置 5-10 分鐘後以 4 $^{\circ}$ C 下 10,000 xg 離心 10 分鐘，將離心後上層含病毒 DNA 之透明水層移至新的微量離心管，加入 100% 酒精 500 μ L，將微量離心管上下反轉混合均勻後於室溫下靜置 3 分鐘，以 4 $^{\circ}$ C 下 10,000 xg 離心 15 分鐘，將上清液倒掉並加入 1 mL 75% 酒精沖洗，於 4 $^{\circ}$ C 下 10,000 xg 離心 2 分鐘，離心完畢後去除離心管內液體，重覆 2 次沖洗步驟後，利用 10 μ L tip 將微量離心管中殘留液體小心吸乾並置於無菌操作臺內風乾，待乾燥完成後加入無菌二次蒸餾水 50 μ L 以溶解 DNA，並保存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱儲存備用，以作為後續 PCR 反應之模板 (template)。

第三節 聚合酶連鎖反應

3.1 引子 (primer) 之選用

鴿子環狀病毒之檢測，共使用了兩組引子，

1. 第一組 PCR 方法參考 Hattermann 等(2002)之方法，其引子對序列如下:

Primer	Sequence
cytB-s	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'
cytB-as	5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Cytochrome B 引子對係用以偵測 Pigeon genome，預期產物長度為 359 bp。

2. 第二組 PCR 方法參考 Todd 等(2006)之方法，其引子對序列如下:

Primer	Sequence
PiCV-V1-f	5'-GCATAAGGTGCCCGTGAAAGG-3'
PiCV-V1-r	5'-ATTCGCGGTCGCTCCGCT-3'

PiCV-V1 引子 1、2 係用以偵測病毒的 *rep* gene，預期產物長度為 331 bp。

鴿子環狀病毒 ORF C1 片段之增幅，參考 NCBI Primer-BLAST 之設計，其引子對序列如下：

Primer	Sequence
PiCV-C1-f	5'- TGACCGACCGGTACCCGCAT-3'
PiCV-C1-r	5'- CATTGCGCCGACGCCGGATCA-3'

PiCV-C1 引子 1、2 係用以偵測病毒的 *capsid* gene，預期產物長度為約 1148 bp。

寵物鳥店之鳥類環狀病毒之檢測：共使用了二組引子

1. Nested PCR 方法參考 Halami 等(2008)之方法，其引子對序列如下：

Primer	Sequence
Cv-s	5'-AGAGGTGGGTCTTCACNHTBAAYAA-3'
Cv-as	5'-AAGGCAGCCACCCRTARAARTCRTC-3'
Primer	Sequence
Cn-s	5'-AGCAAGGAACCCCTCAYYTBCARGG-3'
Cn-as	5'-ACGATGACTTCNGTCTTSMARTCACG-3'

Cv 引子及 Cn 引子 1、2 係 Nested broad-spectrum PCR，用以偵測不同種類環狀病毒的 *rep* gene，預期產物長度為 350 bp。

3.2 聚合酶連鎖反應 (PCR)

本試驗之 PCR 總反應量為 20 μL ，包括前述之 DNA template 2 μL ，Taq DNA Polymerase Mix RED (Ampliqon, Denmark) 10 μL ，10 mM/ μL 正向反向引子溶液各 1 μL ，以及無菌二次蒸餾水 6 μL 。將反應液混合均勻後，置入 0.2 mL 微量離心管中，於 PCR 反應溫控儀 Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA) 中進行反應，反應溫控程式如下：

鴿子環狀病毒之引子 Cyt B-s、Cyt B-as:

PCR 之反應條件：94 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘，使聚合酶活化；接著以 94 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、72 $^{\circ}\text{C}$ 各 30 秒，進行 40 個循環，以 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分鐘結束反應；最後 4 $^{\circ}\text{C}$ 至使用。

鴿子環狀病毒之引子 PiCV-V1-f、PiCV-V1-r:

PCR 之反應條件：94 $^{\circ}\text{C}$ ，2 分鐘，使聚合酶活化；接著以 94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 秒，62.5 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分鐘，72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分鐘進行 45 個循環；以 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 分鐘結束反應；最後 4 $^{\circ}\text{C}$ 至使用。

鴿子環狀病毒之引子 PiCV-C1-f、PiCV-C1-r:

PCR 之反應條件：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘，使聚合酶活化；接著以 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分鐘，66 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分鐘，72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分 30 秒進行 40 個循環；以 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分鐘結束反應；最後 4 $^{\circ}\text{C}$ 至使用。

3.3 巢式聚合酶連鎖反應 (Nested broad-spectrum PCR)

本試驗方法同 3.2 所述，在第一對引子使用 PCR 反應溫控儀反應後，再將其產物當作第二次巢式聚合鏈連鎖反應之 DNA 模板進行反應。

燕雀目鳥類環狀病毒之引子 Cv-s、Cv-as:

PCR 之反應條件：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘，使聚合酶活化；接著以 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒，46 $^{\circ}\text{C}$ 、1

分鐘，72 °C、1 分鐘進行 45 個循環；以 72 °C、5 分鐘結束反應；最後 4 °C 至使用。

燕雀目鳥類環狀病毒之引子 Cn-s、Cn-as:

PCR 之反應條件: 95 °C，5 分鐘，使聚合酶活化；接著以 94 °C、30 秒，56 °C、1 分鐘，72 °C、1 分鐘進行 45 個循環；以 72 °C、5 分鐘結束反應；最後 4 °C 至使用。

3.4 瓊脂糖凝膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

取 1.5~2 g Agarose gel 粉末 (Promega, Madison, WI, USA) 加入 1 x TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) (Amresco, Solon, OH) 100 ml，放入微波爐中加熱至完全溶解，使製成 1.5-2.0 % 的瓊脂糖凝膠，等待冷卻置約 60 °C 左右後即進行鑄膠。膠體凝固後置入迷你電泳槽，在 1 x TAE buffer 中，將增幅之 PCR 產物用 5 μ l 微量吸管加入 1.5% 瓊脂糖凝膠頂端小孔中，同時加入 100 bp 或 1 kbp DNA ladder Marker (Promega, Madison, WI, USA) 5 μ l 進行電泳分析比對。以 100 伏特電泳約 30 分鐘，然後將膠體放入 0.5 μ g/mL SYBR Green 溶液中，在室溫下避光染色 15 分鐘，而後放入水中退染 10 分鐘。取出膠體在照膠系統 254 nm 波長之紫外光下觀察產物大小，照相並記錄，最後將影像存成 JPEG 影像檔。

第四節 多引子滾環式增幅法 (Multiply primed rolling-circle amplification, RCA)

4.1 鴿子環狀病毒之 Multiply primed RCA

利用上述以 PiCV 之引子進行 PCR 反應呈現陽性之鴿子檢體，抽取 1 μ L DNA 進行增幅之。利用 TempliPhi 100 amplification kit (Amersham Biosciences, UK)，放入 0.6 mL 之微量試管中，加入內含 exonuclease-protected random hexamers 之 TempliPhi sample buffer 5 μ L，先放在 95 $^{\circ}$ C 乾浴槽中加熱 3 分鐘使之變性，然後迅速放在冰上降至室溫。準備 premix 包括 TempliPhi reaction buffer (內含鹽類及 dNTPs) 5 μ L 及 TempliPhi enzyme mix (內含 ϕ 29 DNA 聚合酶及含 50 % 甘油之 exonuclease-protected random hexamers) 0.2 μ L 置於冰上混合均勻，之後抽 5 μ L premix 加入已冷卻之樣本。此反應需放置於培養箱中 30 $^{\circ}$ C 作用 16 小時，將反應混合物放置冰上，接著再以 65 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘以去活化 ϕ 29 DNA 聚合酶反應，即可保存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱儲存備用。

4.2 鴿子環狀病毒之限制酶分析

經由多引子滾環式增幅法增幅之 PiCV 產物取 2 μ L，加入限制內切酶 *Not* I 10 U 以消化此增幅之 DNA 產物。限制內切酶 *Not* I 為 PiCV 全段基因體的單一切位，因此應會形成許多雙股、線性複製的 PiCV 全基因體 DNA。以 1.5 % Agarose 膠體進行電泳分析，預期片段產物約為 2 kbp。

第五節 RCA 增幅之 DNA 產物之分子選殖及純化

5.1 鴿子環狀病毒之 DNA 產物純化

取鴿子環狀病毒經 RCA 增幅之產物 10 μ L，經限制內切酶 100 U 消化整夜後，用 1.5 % Agarose 膠體進行電泳分析，確定產物大小位置約為 2 kbp 後，以刀片將

膠體的目標產物位置處切下，以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) 純化套組進行純化。秤取約 300 mg 含 RCA 增幅產物之膠體，放入 1.5 mL 微量離心管中並加入 500 μ L DF buffer，置於乾浴槽中以 60 $^{\circ}$ C 10-15 分鐘待膠體融化，接著取一個 DF Column 置於收集離心小管上，再抽取 800 mg 溶化的液體加入離心管柱，以 14,000 xg 離心 1 分鐘，將除了產物外的液體及離心質離至下收集管中，並加入 400 μ L W1 buffer 於離心管柱中，以 14,000 xg 離心 1 分鐘，將剩餘雜質去除，加入 600 μ L Wash buffer 停留 1 分鐘後，再以 14,000 xg 離心 1 分鐘，將溶劑中所含酒精去除，並再重複一次，以求純化完全，最後加入 50 μ L 的無菌二次蒸餾水，放置 2 分鐘後，以 14,000 xg 離心 2 分鐘，並以乾淨的微量離心管承接離心下之純化 DNA，置於 -20 $^{\circ}$ C 保存，以作為後續選殖之用。

5.2 DNA 接合作用 (Ligation)

將上述純化之 DNA 產物進行選殖。先取純化之 DNA 產物 5 μ L，加入 1 μ L Taq DNA Polymerase 10x reaction buffer (內含 $MgCl_2$) (Viogene, USA)、2 mM dATP 及 5 units Taq DNA Polymerase，在乾浴槽中以 70 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘，使 DNA 產物之片段後面接上 A 序列。

接著使用 pGEM[®]-T Easy Vector kits (Promega, Wisconsin, USA) 進行選殖工作。將 DNA 產物利用離心使其集中於管底。加入 2x T4 ligation buffer 5 μ L，pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng) 1 μ L，DNA 產物 2 μ L，最後加入 T4 DNA ligase (3 Weiss units/ μ L) 1 μ L 於微量離心管中並加入無菌二次蒸餾水使其反應體積成為 10 μ L，混合均勻後靜置於 4 $^{\circ}$ C 作用 16 小時。

5.3 重組質體之轉型作用 (Transformation)

將冷凍的 HITTM-JM109 勝任細胞 (competent cell) (Real Biotech Corporation, Taiwan) 取出放在冰浴上解凍，加入 5 μL 之接合反應產物至勝任細胞中，以手指彈打以幫助混合均勻，之後放置冰上 20 分鐘，此時 DNA 會因勝任細胞上鈣離子所帶的正電而被吸引至勝任細胞外圍，故此時不可隨意移動反應小管。待 20 分鐘後取出冰浴中的反應小管並將之置於 42 $^{\circ}\text{C}$ 乾浴槽 45~60 秒鐘，進行 Heat-shock，再迅速放回冰上 2 分鐘，此時勝任細胞因熱刺激而於其細胞外壁產生小孔而使原本附於勝任細胞外之 DNA 被吸入細胞內，完成轉殖。完成轉殖後的細胞仍然相當脆弱，故加入室溫之 LB broth 800 μL ，並在轉速 250 rpm 震盪、37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱培養 1.5 小時，之後用 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8,000 $\times\text{g}$ 離心 10 分鐘，抽掉部分上清液後，用剩下的 LB broth 將 pellet 打散備用。先在 LB 平板培養基上塗抹一層 Ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20 μL 、一層 50 mg/mL X-gal 40 μL 及一層 100 mM IPTG 40 μL 以方便利用藍白篩的方式判斷轉型作用的結果是否成功。之後加入 50 μL 菌液，將固體培養基移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫箱中培養 16 個小時，挑出白色單一具 Ampicillin 抗性之菌落，轉菌至 LB 平板培養基 (Ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作大量培養。

5.4 質體 DNA 之抽取

在上述之 LB 培養基上，挑選單一菌落培養於 3ml 含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin 的 LB 液體培養基，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養箱中震盪培養 16-18 小時。取 1.5 mL 菌液放入微量離心管中，14,000 $\times\text{g}$ 離心 1 分鐘，倒去上清液，留下約 100 μL 上清液與 pellet，振盪混勻，利用 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) 純化套組進行純化。加入 200 μL PD1 Buffer 振盪混勻，加入 200 μL PD2 Buffer，輕輕搖動後靜置於室溫 2 分鐘，此時細胞壁破裂後使溶液澄清，再加入 300 μL PD3 Buffer，以手搖晃 10 次後立即產生沈澱物，以 4 $^{\circ}\text{C}$ 14,000 $\times\text{g}$ 離心 3 分鐘，接著取一個 PD Column 置於收集離心小管上，將離心後之上清液加入 PD

Column中，以 4 °C 14,000 xg 離心 30 秒，將除了產物外的液體及離心質離至下收集管中並倒掉，再加入 400 μL W1 Buffer，於 4 °C 以 14,000 xg 離心 30 秒，倒掉廢液後再加入 600 μL Wash Buffer，以 4 °C 14,000 xg 離心 30 秒，倒掉廢液再以 4 °C 14,000 xg 離心 3 分鐘，將溶劑中所含酒精去除，並再重複一次，以求純化完全，最後加入 50 μL 的無菌二次蒸餾水，放置 2 分鐘後，以 14,000 xg 離心 2 分鐘，並以乾淨的微量離心管承接離心下之純化之質體，置於 -20°C 保存。

5.5 質體 DNA 之限制酶切割確認

將所抽出來之質體，以 0.8% Agarose gel 電泳分析，為確定選殖成功，以 *EcoRI* 限制酵素進行酵素切割，以確認是否含有 insert DNA 之菌落。因為 *EcoRI* 限制酵素在 pGEM[®]-T Easy Vector 上有兩處切位 (Figure 4)，因此若含有 insert DNA 之質體可以 *EcoRI* 切出二個基因片段，一段為 PiCV DNA 之質體，另一段為載體片段大小。確定載入大小正確後，將選殖出之質體進行定序，若不含有 insert DNA 則不會見有此 DNA 片段，僅能見到載體片段。取 1.5 mL 之微量離心管，依序加入；無菌二次蒸餾水 16 μL、10x buffer 2 μL、質體 DNA 1 μL、*EcoRI* 10 U，於 37°C 乾浴槽中作用 1 小時，再以 1.2% 之瓊脂糖凝膠進行電泳分析。

第六節 核酸序列定序與分析比較及演化分析

6.1 核酸序列之定序

委託基龍米克斯生物科技股份有限公司進行 PCR 產物的核酸雙向定序，其方法簡言之為將以 PCR 產物純化後混合 Perkin Elmer 公司之 ABI PRISM™ Cycle

Sequencing Kit (其在 ddATP、ddTTP、ddCTP 及 ddGTP 上分別標示四種不同顏色之螢光染劑 Dye)，並加入一股 PCR 特異性的引子進行核酸定序反應。得到反應之產物後加入定序用 6% Polyacrylamide sequencing gel 進行電泳，由於不同的 Dye 其吸光波長不同，會有不同訊號產生，因而可解讀出 DNA 序列。定序的結果中黑色代表 Guanine，綠色代表 Adenosine，紅色代表 Thymidine，藍色代表 Cytidine。

6.2 病毒核酸序列之分析

核酸序列經 EditSeq™ 程式雙向判讀、相互比對及錯誤修正後，以商用軟體 Lasergene package (DNASTAR Inc, Madison, WI) 中的 MegAlign program 之 Clustal multiple alignment 方式排列序列，以 Sequence distances 計算序列相似及相異百分比，並利用 MEGA version 5.0，以 Neighbor-joining 方法計算 1000 個重複後得到各節點之 bootstrap 值，建構親緣樹狀圖 (Phylogenetic tree)。並與 NCBI GenBank 上的代表株進行親緣性比對分析。比對參考的序列 Accession number 如 Table 1,2。

第七節 原位雜交法 (*In situ hybridization* ; ISH)

7.1 探針之製備

挑選之前檢測為陽性之 DNA 樣本，利用 PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Germany) 套組進行 DNA 核酸探針的製備。本反應總體積為 25 μ L，加入 10X PCR DIG labeling mix (內含 100 μ M dNTP)、10X PCR buffer (內含 $MgCl_2$ 及 Enzyme mix) 各別取代原來 PCR 反應的 buffer、dNTP 及 Enzyme，再加入原來設計的 V1/Cn primer 0.1 μ M 及 Taq DNA polymerase 0.25 U 混合均勻，之後利用 3-2

所述進行 PCR 反應，使合成完之探針在核甘酸 U 標示有 DIG。反應完成後取 5 μ L PCR 反應產物進行電泳分析，其標定產物因含有 DIG 故應大於未標定者。

7.2 原位雜交之操作方法

取以 Silane coating (Micro slides Mute-Glass) 處理過之組織切片，浸泡於 Xylene (Merck, Germany) 10 分鐘，之後再另一缸 Xylene 脫蠟 10 分鐘。回水 (Rehydration) 則是依序於 100% 酒精、90% 酒精、70% 酒精、50% 酒精、30% 酒精中各浸泡 1 分鐘。水化後再以 PBS (0.14M NaCl, 0.0027M KCl, 0.0015M KH_2PO_4 , 0.008M Na_2HPO_4 , pH 7.2) 浸泡，將玻片上多餘的 PBS 去除後，以 Proteinase K (200 μ g/mL) (Roche, Germany) 覆蓋組織並蓋上蓋玻片作用 20-30 分鐘，之後以 PBS 浸泡。於玻片上覆蓋 Pre-hybridization buffer (50 % formamide, 0.9 M NaCl, 0.02 M tris HCl 及 0.01 % SDS, 調至 pH 7.2) 並蓋上蓋玻片，加熱至 95 $^{\circ}\text{C}$ 3-5 分鐘後置於冰上 3-5 分鐘。雜交前探針以 hybridization buffer (50 % formamide, 0.9M NaCl, 0.02 M tris HCl, 0.01% SDS, pH 7.2) 稀釋成 5ng/ μ L，於 100 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 3-5 分鐘，之後迅速移至冰中 3-5 分鐘。將 Pre-hybridization buffer 去除後，每一玻片覆蓋 200 μ L 含探針之 hybridization buffer 並蓋上蓋玻片，於 47 $^{\circ}\text{C}$ 進行反應，作用 8-10 小時。作用完後玻片依序以 4x SSC (1x SSC 包含 50 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0)、2x SSC、1x SSC、0.5x SSC、0.01x SSC 浸潤清洗各 15 分鐘，之後浸潤於 TBS (0.1M tris HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.5)，再以 blocking solution (100 mM Maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) (Roche, Germany) 覆蓋玻片 30 分鐘。以 TBS 清洗後，將 100 μ L 經 TBS 稀釋 200 倍的 Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment (Roche, Germany) 覆蓋玻片後，蓋上蓋玻片作用 1 小時。作用完後以 TBS 清洗，再加入經由 Buffer II (0.1 M tris HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl_2 , pH 9.5) 稀釋 50 倍之 NBT/BCIP (Roche, Germany) 呈色劑呈色，直至組織邊緣呈現紫色即可終止反

應，約需 5-10 分鐘。呈色後以 75% 酒精當溶劑，配製成 1% Methyl green (Sigma, U.S.A) 溶液當作 counter stain，作用時間約 15 分鐘。最後以無菌二次蒸餾水清洗，完成後待乾以阿拉伯膠進行封片，最後於光學顯微鏡下觀察。



第四章 結果

第一節 聚合酶鏈鎖反應檢測結果

1.1 鴿子環狀病毒之陽性率

將鴿子的共泄腔拭子萃取 DNA 後，以 2 組 PiCV 引子對進行 PCR 檢測，第一組為以引子 Cyt-B 增幅出 Pigeon genome，所得產物長度為約 359 bp (Figure 5)，第二組引子 PiCV-V1 用以增幅出病毒的 ORF V1，所得產物則約 331 bp (Figure 6)，並計算其所能偵測到的最低核酸濃度為 5.7×10^{-6} ng/ μ L。

自 2010-2011 年共計 2 年，依照地理分布之鴿舍採樣鴿舍共計 56 個鴿舍。經 PCR 檢測可得共計 53 個鴿舍有陽性鴿子，陽性率為 94.6 % (53/56)。

北部採樣之賽鴿及陽性隻數分為台北市及新北市 171 隻呈陽性有 106 隻、基隆市 20 隻呈陽性有 11 隻、桃園縣 30 隻呈陽性有 25 隻、新竹縣 75 隻呈陽性有 44 隻，共計 296 隻呈陽性為 186 隻，陽性率為 62.8 % (186/296)；中部採樣之賽鴿及陽性隻數分為苗栗縣 90 隻呈陽性有 75 隻、台中市 145 隻呈陽性有 100 隻、彰化縣 55 隻呈陽性有 48 隻、南投縣 20 隻呈陽性有 6 隻、雲林縣 130 隻呈陽性有 89 隻，共計 440 隻呈陽性為 318 隻，陽性率為 72.3 % (318/440)。以上合計共有 736 個賽鴿檢驗樣本，總陽性率為 68.5 % (504/736)。各地區鴿舍之採樣隻數、鴿種及陽性率情形請見 Table 3。

依各地區賽鴿之陽性率可見彰化縣 87.3 % (48/55)、桃園縣 83.3 % (25/30)、苗栗縣 83.3 % (75/90)之陽性率最高，其次是台中市 69.0 % (100/145)、雲林縣 68.5 % (89/130)、台北市及新北市 62.0 % (106/171)、新竹縣 58.7 % (44/75)、基隆市 55.0 % (11/20)，而南投縣 30.0 % (6/20)的陽性率最低，顯示陽性率最高的幾個縣市，其賽

鴿飼養隻數或密度並非全台最高，可能與其鴿舍飼養管理方式有關。

另北部檢測種鴿及陽性隻數分別為台北市及新北市 22 隻呈陽性有 15 隻、基隆市 10 隻呈陽性有 5 隻、桃園縣 10 隻呈陽性有 2 隻、新竹縣 15 隻呈陽性有 0 隻，共計 57 隻呈陽性為 22 隻，陽性率為 38.6 % (22/57)。其中以台北市及新北市 68.2 % (15/22) 陽性率最高，其次為基隆市 50 % (5/10)、桃園縣 20 % (2/10)，而新竹縣則無偵測到陽性樣本(0/15)。其中台北市及新北市有 2 場、桃園縣與新竹縣各 1 場為種鴿及賽鴿皆有飼養之鴿舍，檢測結果台北市及新北市賽鴿陽性率為 73.3 % (22/30)、種鴿陽性率為 68.2 % (15/22)；桃園縣賽鴿陽性率為 90 % (9/10)、種鴿陽性率為 20 % (2/10)；新竹縣賽鴿陽性率為 80 % (8/10)、種鴿陽性率為 0 (0/15)，可見賽鴿的陽性率還是較種鴿為高，可能與其需長時間進行飛行訓練等緊迫因子有關，也可能因種鴿年齡較大，病毒之檢測方法可能受限等因素。

在北部地區的賽鴿中有臨床症狀包括食慾不振、體重下降、下痢、飛行表現不佳等共計 25 隻，而 PiCV 陽性率為 80.0 % (20/25)，陰性率為 20.0 % (5/25)；沒有臨床症狀的鴿子共 271 隻，而 PiCV 陽性率為 61.3 % (166/271)，陰性率為 38.8 % (105/271)，由卡方分析推知臨床症狀與陽性率有關，呈顯著差異 ($p \text{ value} < 0.05$)。在中部地區的賽鴿中有臨床症狀共計 83 隻，而 PiCV 陽性率為 85.5 % (71/83)，陰性率為 14.5 % (12/83)；沒有臨床症狀的鴿子共 357 隻，而 PiCV 陽性率為 69.2 % (247/357)，陰性率為 30.8 % (110/357)，由卡方分析推知臨床症狀與陽性率有關，呈顯著差異 ($p \text{ value} < 0.05$)。整體來說，北部及中部的賽鴿中有臨床症狀而呈陽性者為 84.3 % (91/108)，有臨床症狀而呈陰性者為 15.7 % (17/108)；沒有臨床症狀而呈陽性者為 65.8 % (413/628)，沒有臨床症狀而呈陰性者為 34.2 % (215/628)。由此結果經卡方分析可知臨床症狀和 PiCV 陽性率有關，呈極顯著差異 ($p \text{ value} < 0.01$) (Table 4)。

在野鴿方面自 2009 年到 2010 年共計 2 年之環狀病毒的調查結果其陽性率為 31 % (121/391) (Table 5)。台灣各地區的野鴿環狀病毒盛行率差異不大，且相較於

家鴿之盛行率為低，推測可能因野鴿不似家鴿密集大量飼養，且需強迫接受許多長短途飛行訓練等緊迫因子。然野鴿在自然界中生存需自行覓食，有時也會到鴿舍附近搶食，或是與飛行訓練之家鴿接觸而有感染環狀病毒之可能。

1.2 寵物鳥店鳥類環狀病毒之陽性率

寵物鳥店鳥類之糞便拭子萃取 DNA 後，以 Cv 引子及 Cn 引子進行 Nested broad-spectrum PCR，用以偵測不同種類鳥類之環狀病毒的 ORF V1，增幅所得之產物長度約為 350 bp (Figure 7)。

自 2010-2011 年共計 2 年，採樣的寵物鳥店數共計 18 場。經 Nested broad-spectrum PCR 檢測可得共計 16 場有呈現環狀病毒陽性之鳥類，寵物鳥店之陽性率 88.9 % (16/18)。

本次研究總檢測隻數為 310 隻，依其送檢鳥種隻數、環狀病毒陽性隻數及陽性率分別為為鸚形目 (order Psittaciformes) 之虎皮鸚鵡 (*Melopsittacus undulatus*) 10 隻呈陽性為 6 隻，陽性率為 60 %；桃面愛情鳥 (*Agapornis roseicollis*) 6 隻呈陽性為 2 隻，陽性率為 33.3 %；鴿形目 (order Columbiformes) 之紅鳩 (*Streptopelia tranquebarica*) 46 隻呈陽性為 20 隻，陽性率為 43.5 %；而在燕雀目 (order Passeriformes) 鳥類部分共有四種鳥種，分別為綠繡眼 (*Zosterops japonicus*)、斑文鳥 (*Lonchura punctulata*)、白頭翁 (*Pycnonotus sinensis*) 及麻雀 (*Passer montanus*)。其中綠繡眼共檢測 111 隻呈陽性為 102 隻，陽性率為 91.9 %；斑文鳥 34 隻呈陽性為 18 隻，陽性率為 52.9 %；白頭翁 83 隻呈陽性為 17 隻，陽性率為 20.5 %；麻雀 20 隻呈陽性為 4 隻，陽性率為 20 %。總陽性隻數為 169 隻，總陽性率為 54.5 % (169/310) (Table 6)。

依送檢鳥種之環狀病毒陽性率配合地理位置之結果為鸚形目 (order Psittaciformes)：高雄市 50 % (8/16)；鴿形目之紅鳩：台北市及新北市 45 % (9/20)、

台中市 42.3 % (11/26)；燕雀目鳥類之綠繡眼：台北市及新北市 94 % (94/100)、高雄市 77.8 % (7/9)、屏東縣 50 % (1/2)；斑文鳥：台北市及新北市 53.3 % (8/15)、宜蘭縣 47.1 % (8/17)、屏東縣 100 % (2/2)；白頭翁：台北市及新北市 23.3 % (7/30)、宜蘭縣 20.8 % (5/24)、台中市 17.2 % (5/29)；麻雀：台北市及新北市 10 % (1/10)、台中市 30 % (3/10)。由此可見台灣地區綠繡眼之環狀病毒陽性率較高。

第二節 環狀病毒之基因分析

2.1 核酸序列及胺基酸序列之相似度

2.1.1 鴿子環狀病毒 ORF V1 基因

本研究將經由 2 組 PiCV 引子對 (Cyt-B 與 PiCV-V1) 進行 PCR 檢測為陽性之 DNA 樣本：野鴿共 7 株，以及依地理位置分布挑選出北部 9 株及中部 8 株共 17 株，利用 PiCV-V1 引子對增幅出之核酸序列，其 PiCV ORF V1 核酸序列片段與 GenBank 之不同國家的 PiCV 分離株共 14 株，以 DNASTAR 軟體中 MegAlign program 之 Clustal W 的方法比對，計算各核酸序列之相似性 (identity) 與相異性 (divergence) 百分比。

由序列比對結果發現，本研究中此 7 株野鴿分離之 ORF V1 核酸序列片段其相似性百分比為 95.8-100 %，由台灣北部及中部分離之 17 株家鴿核酸序列片段相似性百分比為 96.5-100 %。和其他國家之 PiCV 分離株共 14 株比較，可得相似性百分比為 94.3-99.6 %，而其相異性百分比為 0.4-5.2 % (Figure 8A)。將本研究所增幅出 PiCV ORF V1 片段核酸序列轉譯出胺基酸進行分析比對，ORF V1 可轉譯出 109 個胺基酸，7 株由野鴿分離出的胺基酸序列相似性百分比為 93.5-100 %，台灣北部

及中部之家鴿 17 株分離株胺基酸序列相似性百分比為 90.3-100 %，而與 GenBank 之 PiCV 分離株胺基酸序列相比，其胺基酸相似性百分比為 87.1-100 % (Figure 8B)。因 ORF V1 片段為病毒複製之保留片段，故可見台灣及其他國家之 ORF V1 核酸及胺基酸序列片段差異不大。

2.1.2 鴿子環狀病毒 ORF C1 基因

上述鴿子 DNA 陽性樣本包括野鴿 7 株與家鴿 17 株，利用 PiCV-C1 引子對進行 ORF C1 之增幅，所得產物長度為約 1148 bp (Figure 9)。增幅之核酸序列片段與 GenBank 之不同國家的 PiCV 分離株共 14 株以 DNASTAR 軟體中 MegAlign program 之 Clustal W 的方法比對，計算各核酸序列之相似性 (identity)與相異性 (divergence)百分比。

由序列比對結果發現，此 7 株野鴿分離之 ORF C1 核酸序列片段其相似性百分比為 82-100 %，其中 2009 年分離到之野鴿病毒株與其他 2010 年所分離到之病毒株差異較大；而 17 株家鴿所分離之核酸序列相似性百分比為 90.6-100 %，相異性百分比為 0-9.2 %，北部及中部地區所分離到之家鴿其差異性不大，顯示其感染來源可能較相近；和其他國家之 PiCV 分離株比較可得相似性百分比為 74.2-99.2 % (Figure 10.A)，台灣所分離之病毒株與比利時株較相近，可能為其感染之來源國家。將本研究所增幅出 PiCV ORF C1 片段核酸序列轉譯出胺基酸進行分析比對，ORF C1 可轉譯出 223 個胺基酸，此 7 株野鴿分離之 ORF C1 胺基酸序列片段其相似性百分比為 82.8-100 %，此 17 株台灣分離株經相比後相似性百分比為 92.4-100 %，而與 GenBank 之 PiCV 胺基酸序列比對，其相似性百分比為 73.2-99.8 %，歧異度最高可達 37.3 % (Figure 10.B)。

2.1.3 燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF V1 基因

本研究將經由 Cv 引子及 Cn 引子進行 Nested broad-spectrum PCR 檢測為陽性之 169 個樣本，進行定序後以 DNASTAR 軟體中 MegAlign program 之 Clustal W 的方法比對，與 NCBI BLAST 比對結果可見所有鸚形目之樣本皆為 PBF DV，而所有鴿形目之樣本也皆為 PiCV，但在燕雀目鳥類中除了麻雀之樣本皆為 PiCV 外，其他 3 種鳥類之 ORF V1 基因序列和 PBF DV、PiCV、FiCV 及 RaCV-like 相似，而以感染 PBF DV 為最多 (Table 7)。

將此陽性樣本從中挑選 26 株進行 ORF V1 之核酸序列進行定序，其 ORF V1 核酸序列片段與 GenBank 之不同鳥種的環狀病毒分離株共 5 株，以 DNASTAR 軟體中 MegAlign program 之 Clustal W 的方法比對，計算各核酸序列之相似性 (identity) 與相異性 (divergence) 百分比。

由序列比對結果發現，此 26 株不同燕雀目鳥類之 ORF V1 核酸序列相似性百分比為 61.2-100.0 %。其中麻雀分離株 Pm/207、Pm/209、Pm/210、Pm/953、白頭翁分離株 Ps/1009、Ps/1010、斑文鳥分離株 Lp/230、Lp/232、Lp/863 及綠繡眼分離株 Zj/109、Zj/841 最為相近，其相似性百分比為 93.5-100 %，且地理位置遍布台灣北、中、南、東部，並與其他國家之 PiCV 分離株相似性百分比為 92.2-96.6%；斑文鳥分離株 Lp/861、Lp/864、Lp/894、Lp/895、白頭翁分離株 Ps/143、Ps/913 及綠繡眼分離株 Zj/842、Zj/845、Zj/846、Zj/851 最為接近，其相似性百分比為 91.4-100 %，且地理位置同樣也遍布台灣北、中、南、東部，而與其他國家之 PBF DV 分離株相似性百分比為 91.4-96.7 %；斑文鳥分離株 Lp/258 及 Lp/259 其相似性百分比為 100 %，皆來自屏東縣，而與 FiCV 分離株相比較為接近其相似性百分比為 88.8 %；斑文鳥分離株 Lp/897、白頭翁分離株 Ps/1008 及綠繡眼分離株 Zj/855 最為接近，其相似性百分比為 97.0-99.6 %，且地理位置也遍布台灣中、南、東部，而和 RaCV 分離株相比較為接近，可得其相似性百分比為 81.9-83.2 %。將本研究所增幅出 ORF

V1 片段核酸序列轉譯出胺基酸進行分析比對，ORF V1 可轉譯出 116 個胺基酸，與 GenBank 之不同鳥種之環狀病毒胺基酸序列相比對，其相異性百分比最多可達 66.2 % (Data not show) 。

2.1.4 燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF C1 基因

將上述利用定序後之不同種類鳥類的環狀病毒 ORF V1 片段，從中挑選 5 株和鴿子環狀病毒相近的核酸序列：白頭翁分離株 Ps/1010、綠繡眼分離株 Zj/841、斑文鳥分離株 Lp/230 及 Lp/863 與麻雀分離株 Pm/207，利用 PiCV C1 之引子對進行 ORF C1 片段之增幅，可得到產物大小為 1148 bp。並與上述 7 株野鴿分離株及 GenBank 中不同國家之鴿子環狀病毒分離株以 DNASTAR 軟體中 MegAlign program 之 Clustal W 的方法比對，計算各核酸序列之相似性 (identity) 與相異性 (divergence) 百分比。此 5 株 ORF C1 核酸序列片段相比之結果可得其相似性百分比為 79.7-99.6 %。而將此 5 株與上述 7 株野鴿分離株相比，其相似性百分比為 79.7-100 %，其中麻雀分離株 Pm/207 與 2009 年之野鴿分離株相似性達 100 %；另再將此 5 株和 GenBank 中不同國家之鴿子環狀病毒分離株相比，可得相似性百分比為 77.2%-99.6%，其相似性較高的國家皆不盡相同 (Figure 12.A)。將本研究所增幅出 PiCV ORF C1 片段核酸序列轉譯出胺基酸進行分析比對，ORF C1 可轉譯出 223 個胺基酸，此 5 株燕雀目鳥類分離之 ORF C1 胺基酸序列片段其相似性百分比為 78.2-100 %，和此 7 株台灣分離株經相比後相似性百分比為 78.2-100 %，而與 GenBank 之 PiCV 胺基酸序列比對，其相似性百分比為 76.4-100 %，歧異度最高可達 29.1 % (Figure 12.B)

2.2 環狀病毒親緣樹狀圖

2.2.1 鴿子環狀病毒 ORF V1 基因

將 24 株由野鴿與北部及中部所分離之 PiCV ORF V1 基因，與 GenBank 之不同國家分離之鴿子環狀病毒 ORF V1 基因片段序列共 14 株，使用 MEGA version 5.0 進行多序列比對，建構出親緣樹狀圖，以 Neighbor-joining 方法計算 1000 個重複後得到各節點之 bootstrap 值，依其演化的距離及相異度可區分為 3 個分支，其中所有家鴿分離株分配在不同的 3 個分支中，而野鴿除了 2009 年之分離株在第 I 個支群外，其餘皆在第 III 個支群 (Figure 13)。

2.2.2 鴿子環狀病毒 ORF C1 基因

將上述 24 株由野鴿與北部及中部所分離之 PiCV ORF C1 基因，與 GenBank 中不同國家分離之鴿子環狀病毒 ORF C1 基因片段序列，使用 MEGA version 5.0 進行多序列比對，建構出親緣樹狀圖，以 Neighbor-joining 方法計算 1000 個重複後得到各節點之 bootstrap 值，依其演化的距離及相異度可區分為 4 個分支：第 I 個支群中包含本研究之 9 株家鴿及 2 株野鴿分離株，也包括 2 株比利時分離株與 1 株北愛爾蘭分離株；第 II 個支群包含本研究之 3 株家鴿及 1 株野鴿分離株，也包括 2 株美國株與北愛爾蘭分離株、法國分離株與德國分離株各 1 株；第 III 個支群包括本研究之 4 株野鴿分離株，以及比利時分離株與美國分離株各 1 株；第 IV 個支群包含本研究之 5 株家鴿分離株，與 2 株中國分離株及義大利分離株與澳洲分離株各 1 株 (Figure 14)。

2.2.3 燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF V1 基因

將 26 株由寵物鳥店分離不同燕雀目鳥種經 Cv/Cn 引子對進行 Nested

broad-spectrum PCR 增幅出之環狀病毒 ORF V1 基因，連同 NCBI 基因庫中不同品種鳥類之環狀病毒 ORF V1 共 5 株基因片段序列，使用 MEGA version 5.0 進行多序列比對，建構出親緣樹狀圖，以 Neighbor-joining 方法計算 1000 個重複後得到各節點之 bootstrap 值，依其演化的距離及相異度可區分為 4 個分支，包括：第 I 個支群和 PiCV 較為接近，且包括了綠繡眼、斑文鳥、白頭翁及麻雀等 4 種鳥種，其地理位置遍布台灣北、中、南、東部；第 II 個支群和 FiCV 較為接近，包含 2 株斑文鳥，皆來自屏東縣；第 III 個支群為 RaCV 和其他 3 株綠繡眼、斑文鳥及白頭翁較為接近；第 IV 個支群為和 PBFDV 較為接近，包括了 10 株綠繡眼、斑文鳥及白頭翁等，其地理位置同樣遍布台灣北、中、南、東部 (Figure 15)。

2.2.4 燕雀目鳥類之環狀病毒 ORF C1 基因

將上述利用定序後之不同燕雀目鳥種的環狀病毒 ORF V1 片段，從中挑選 5 株和鴿子環狀病毒相近的核酸序列，並與上述 7 株野鴿分離株及 GenBank 中不同國家之鴿子環狀病毒分離株基因片段序列，使用 MEGA version 5.0 進行多序列比對，建構出親緣樹狀圖，以 Neighbor-joining 方法計算 1000 個重複後得到各節點之 bootstrap 值，依其演化的距離及相異度可區分為 5 個分支：第 I 個支群包含一株麻雀分離株 Pm/207、白頭翁分離株 Ps/1010 與斑文鳥分離株 Lp/863，其中麻雀分離株 Pm/207 與 2009 年之野鴿分離株相近，而另兩株與北愛爾蘭分離株相近；第 III 個支群可見一株綠繡眼分離株 Zj/841，與中國分離株屬同分支；第 IV 個支群包括一株斑文鳥分離株 Lp/230 與其他 6 株 2010 年之野鴿分離株。由此可推測在大自然中野鴿將環狀病毒傳播至不同鳥種間之傳染途徑可能存在，且燕雀目鳥類感染鴿子環狀病毒之來源也相當複雜 (Figure 16)。

第三節 鴿子及燕雀目鳥類病例

3.1 聚合酶連鎖反應

由台北市動物保護處送來 4 隻有神經症狀之野鴿，採集糞便拭子經 PCR 檢測，其中第 1 隻野鴿呈現陽性反應，同時亦採集喉頭拭子、血液及腦、氣管、心臟、肺臟、嗉囊、沙囊、腸道、肝臟及腎臟等組織樣本作為檢體，經 PCR 檢測後呈現陽性反應的臟器包括腦、氣管、肺臟、嗉囊、腸道、肝臟及腎臟 (Figure 17)。

由台北市三興寵物鳥店購買的 2 隻已成年、外觀正常之綠繡眼，採集糞便拭子經 PCR 檢測皆呈陽性反應，而在臟器 PCR 檢測方面可得第 1 隻綠繡眼在腦、心臟及腸道呈現陽性反應；第 2 隻綠繡眼在肺臟、嗉囊、腸道、肝臟及脾臟有呈現陽性反應(Figure 18)。



3.2 原位雜交法 (*In situ hybridization*)

3.2.1 探針製備

由本研究參考 Todd 等(2006)及 Halami 等(2008)所設計的 PiCV-V1 及 Cn 引子，挑選出已經此兩種引子檢驗為陽性之 DNA 樣材，經核酸序列標定使合成完之探針在核苷酸 U 標示有 DIG，因此標定完成的 PCR 產物會大於未標定的 PCR 產物，以電泳分析會分別大於 331bp 及 350bp (Figure 19)。

3.2.2 病毒核酸之偵測

使用原位雜交法偵測病毒核酸於細胞內存在的位置，將病例一之第 1 隻利用 PCR 檢測糞便拭子及其他臟器呈現陽性的野鴿，進一步進行原位雜交反應，可見到在肝臟、腎臟及肺臟偵測到陽性訊號，此陽性訊號可在被感染細胞的細胞質內被偵測到 (Figure 20)。而病例二之 2 隻外觀正常之綠繡眼利用 PCR 檢測糞便拭子及其他臟器呈現陽性後，再利用原位雜交反應，僅在其中一隻的肝臟檢體中偵測到極少量之病毒核酸陽性反應(Figure 21)。

第四節 鴿子環狀病毒之質體 DNA

將經由引子對 PiCV-VI 進行 PCR 檢測為陽性之鴿子 DNA 檢體，挑選北部及中部各一株進行多引子滾環式擴增法 (Multiply primed rolling-circle amplification)，再經由限制內切酶 *Not I* 消化此增幅之 DNA 產物後所得產物長度約 2kbp (Figure 22)。經電泳結果確認目標正確後，將此 2 株 DNA 產物純化，送入 pGEM[®]-T Easy Vector 中，再利用 HIT[™]-JM109 勝任細胞進行轉型作用，經由藍白篩結果挑出白色單一具 ampicillin 抗性之菌落後將質體製備，並以 *EcoRI* 限制酵素進行酵素切割，以確認是否含有 insert DNA 之菌落，含有 insert insert DNA 之質體，可以 *EcoRI* 切出二個基因片段，一段為插入之 DNA 質體及一小部分連接之載體，長度約為 2 kbp 再加上約 72 bp 長度大小，另一段為載體 pGEM[®]-T Easy Vector，長度約為 3 kbp 大小 (Figure 23)。進行核酸序列之定序後確認為全段之鴿子環狀病毒，可作為日後研究 PiCV 之陽性對照組。

第五章 討論

第一節 陽性率之討論

經本研究由共泄腔拭子檢測鴿子環狀病毒，可得鴿舍的陽性率為 94.6 % (53/56)，而賽鴿的整體陽性率為 68.5 % (504/736)，顯示此種病毒在台灣的鴿舍中有高的盛行率。相較於其他國家如匈牙利的鴿子環狀病毒盛行率調查中可見鴿舍的陽性率為 93.8 % (15/16)，鴿子的陽性率為 56.9 % (66/116) (Cságola et al., 2011)，中國東部 6 省份的賽鴿總陽性率為 75 % (Zhang et al., 2011)，北愛爾蘭其陽性率為 80.9 % (38/47) (Todd et al., 2006) 及歐洲中部已高達 90 % 之盛行率 (Schmidt et al., 2008)，由此可知許多國家包括台灣都有鴿子環狀病毒的高盛行率。

在本研究中北部及中部各地區 2 至 6 月齡賽鴿之環狀病毒檢測可見陽性率最高的幾個縣市包括彰化縣、桃園縣、苗栗縣等，其賽鴿飼養隻數或密度並非全台最高，可能與其鴿舍與飼養管理等方式有關，如飛行訓練頻繁、引進新鴿的頻率較高及隔離措施不確實，或是有許多不顯性感染的鴿子存在於鴿舍中造成持續排毒而造成感染的可能等因素。依照賽鴿鴿主所提供的飼養調查中顯示在鴿舍環境管理方面，大多鴿舍皆具有可擋風避雨的設備且活動空間充足，僅少數較為擁擠或炎熱，而清掃鴿舍的頻率約每天一次到每週一次以上，但約七成的鴿主在進出不同鴿籠時未必每次都會更換工作服或鞋子，這可能會形成一環狀病毒機械性傳播之途徑。而近一半的鴿主表示在鴿舍的周圍偶而可見到其他野鴿、野鳥或是其糞便，這也可能造成環狀病毒在鴿子甚或其他鳥種間互相傳播的可能來源。另外有幾項常會引起鴿子緊張的事或物包括鴿舍附近噪音吵雜、來往車輛多或是野鳥搶食等都會使鴿子容易驚嚇或不安，但飛行訓練頻繁為最常讓賽鴿緊迫的主要原因之一，這也間接使得已有環狀病毒感染的鴿子更容易因緊迫之因素導致免疫抑

制而增加繼發性感染的可能性，並提高生病或死亡的機會；在飼養管理方面，鴿主們引進新賽鴿的頻率從每 3 個月一次到每年一次不等，引進新賽鴿時通常會先隔離一陣子後再混入飼養，但因鴿子環狀病毒未必都會出現臨床症狀或臨床症狀並不典型，常呈不顯性感染，故新進賽鴿除了造成鴿群緊迫外，也可能將環狀病毒散播至鴿舍中水平傳播開來。環狀病毒的篩檢可利用 PCR 等方式得知，但目前並非常態性的檢測項目，也無針對環狀病毒之疫苗可供施打，再加上環狀病毒對熱、消毒劑及清潔劑皆有非常強的抗性，即使鴿主有定期進行鴿舍之清潔消毒，也未必能完全清除，使得環狀病毒之盛行率高，移除不易。故平時鴿舍除了鴿舍環境及飼養管理方面如進出不同鴿舍應更換鞋子或避免野鳥搶食等需注意外，應減少如過度擁擠、炎熱或過度頻繁的飛行訓練等緊迫因子的因素，鴿舍中的鴿子也應定期施打疫苗、給予適當之營養補充，確保其自身免疫力；若環狀病毒感染嚴重，唯一可挽救的方法就是清空鴿舍至少一年以上，讓病毒自然死亡並排除，再重新引進新鴿。不管自國外或國內引進鴿子時，除了嚴格檢疫外，建議增加環狀病毒的檢測，避免引進具環狀病毒之不顯性帶原者而汙染整個鴿舍，經研究顯示年輕的雛鴿在出生後的第 15 天開始即可被感染，至第 51 天顯示鴿子可全部被感染(Duchatel et al., 2005)，所以雛鴿的感染來源包括親代的水平或垂直傳播，或是在孵化後不久即經由鴿舍環境中已存在的環狀病毒而被感染 (Todd et al., 2006)，建議鴿主將已檢驗呈陽性之鴿子移除，以避免環狀病毒在鴿舍中持續以垂直或是水平傳播的方式散播，無法消滅，且在引進至鴿舍時需先嚴格隔離 2-4 週，確定無其他疾病之疑慮後使得混養。

另本研究由共泄腔拭子檢測種鴿 (1 歲以上) 的環狀病毒，其陽性率為 38.6 % (22/57)，相較於年輕賽鴿為低，推測可能的因素包括因為有些鴿舍的種鴿和賽鴿是分開飼養，可能減少了互相感染的機會，且種鴿不須經常性地進行飛行訓練，緊迫因子較賽鴿少，故其陽性率較賽鴿為低；亦或者因鴿子在 6 到 8 月齡達性成熟時華氏囊就會萎縮消失，進而影響環狀病毒在共泄腔之濃度，使得利用 PCR 進

行檢測得到較少之陽性率。Duchatel 等人在 2005 年成鴿的研究中，顯示年紀較大的鴿子其盛行率比年輕鴿較低，且主要以利用 PCR 檢測脾臟樣本可得較高之陽性率 (84.2%, 16/19)，而成鴿可能感染的來源包括最常見的是在年輕時即已感染此病毒，或是最近才暴露於 PiCV 而感染等，但此研究不確定利用 PCR 偵測這些年紀較大的鴿子，其偵測到的是完整病毒顆粒內的 DNA 或者只剩無病毒封套的 DNA (Duchatel et al., 2005)；本研究中種鴿僅用共泄腔拭子進行 PCR 檢測似乎不夠周全，因種鴿年齡較大且身經百戰，可能體內已有環狀病毒之抗體存在，應配合血液檢查其是否有抗體力價之存在才能較客觀的作為環狀病毒陽性之判斷，然種鴿可能因發情期或繁殖期等荷爾蒙之變化而影響其血液檢查之結果，故如何有效的偵測種鴿是否有環狀病毒的感染仍須研究。目前僅少數研究提及有關垂直傳染的可能性 (Soike et al., 2001；Duchatel et al., 2005, 2006)，但尚未能證明此病毒是否能在生殖組織或精子內增殖，亦或是在胚胎中增殖並造成孵化之幼鴿的感染。

在本研究的賽鴿總數中具臨床症狀而呈陽性者為 84.3 % (91/108)，而不具臨床症狀卻呈陽性者為 65.8 % (413/628)，可推知此 PiCV 在鴿群中易呈現不顯性感染而繼續散播病毒，這也是移除此病毒困難的地方。而經卡方分析可得其有極顯著差異 (p value < 0.01)，表示臨床症狀和 PiCV 陽性率有相關性，故可推知若鴿舍中有呈現疲倦、食慾不振、呼吸不順、體重下降、下痢或飛行表現不佳等臨床症狀的鴿子，其有 PiCV 的可能性相對較高，建議鴿主需立即進行隔離以避免環狀病毒藉由糞便水平傳播之可能性。

而在寵物鳥店中所測得的鳥類環狀病毒陽性率，在鸚形目 (order Psittaciformes) 之兩種鸚鵡 (虎皮鸚鵡與桃面愛情鳥) 測得其陽性率為 50 % (8/16)，和許等在 2006 年發表之台灣 PBFVDV 陽性率為 41.2% (許等, 2006) 相似。而本次研究首次在燕雀目鳥類之綠繡眼 (*Zosterops japonicus*)、斑文鳥 (*Lonchura punctulata*)、白頭翁 (*Pycnonotus sinensis*) 及 麻雀 (*Passer montanus*) 中利用 Nested broad-spectrum PCR 進行環狀病毒之檢測，此種巢式 PCR 引子對為比對 11 種不同種之環狀病毒

基因序列，針對 Rep-encoding region 而設計 (Halami et al., 2008)，其中尤以綠繡眼之陽性率最高，達 91.9 % (102/111)，其次是斑文鳥 52.9 % (18/34)，接著為白頭翁及麻雀。且依各地陽性率可見綠繡眼在北部及南部分離率皆高，斑文鳥次之。燕雀目鳥類環狀病毒之總陽性率為 56.9 % (141/248)，由此可推知環狀病毒在燕雀目鳥類中已呈現高的盛行率。因本次研究的鳥類糞便拭子來源皆為各地區之寵物鳥店，而這些鳥種皆為台灣本地長住的留鳥，在野外經常見到且數量眾多，以綠繡眼為例，在台灣的繁殖期為 4 到 7 月，有些專業捕鳥人士會將雛鳥及成鳥整窩捕捉後送至寵物鳥店進行培育並供商家販賣。這些鳥類感染環狀病毒的時機可能為成鳥在未被捕捉前在自然界中已經感染或和其他鳥種混合感染，並藉水平或垂直的傳播方式感染雛鳥後，再將病毒帶至密集飼養的鳥籠中造成群聚感染；亦或是原本在無環狀病毒感染的狀態下，在寵物鳥店中因鳥種眾多，且籠子與籠子間緊密連接，飼養密度又高，而被環狀病毒污染之糞便、羽毛或器具等藉水平方式傳播。在野外遭受捕捉，運輸到寵物鳥店及密集飼養在狹小的籠子中，都會容易造成緊迫而使已有環狀病毒感染的鳥類免疫系統更加抑制，使得繼發性感染的可能性提高而增加死亡率的風險，也會連帶影響經濟效益。

第二節 診斷方法之討論

本研究選擇利用共泄腔拭子作為檢測是參考 Todd 等人的研究，經由 PCR 檢測共泄腔拭子及血液之比較，共泄腔拭子的檢測率為 42.2 % (38/70)，血液的檢測率為 16.7 % (15/90)，可得共泄腔拭子的檢測率較高；且依實驗得共泄腔拭子可自 3 週到 31 週的鴿子被檢測出，而用血液檢測只能檢測到 23 週，綜上可見共泄腔拭子可得到較高的檢測率，且可在較高年齡的鴿子中檢測出 (Todd et al., 2006)，故本研究選擇使用共泄腔拭子作為檢測之依據。

共泄腔拭子的檢測率高可推知病毒在華氏囊的病毒含量極高，雖然 PiCV 感染腎臟及生殖道其排出病毒的途徑也是共泄腔，但以下研究仍顯示最常可以檢測到 PiCV 的臟器為華氏囊及腸道：在 Soike 等人的研究中顯示有感染 PiCV 的樣材中在電子顯微鏡的檢測顯示華氏囊的檢出率為最高 (Soike et al., 2001)，Smyth 等人利用 ISH 診斷華氏囊中 PiCV 之檢出率達 89 % (95/107)，並且在腸道也可見到 PiCV 的嚴重感染 (Smyth et al., 2001)，而 Todd 等人利用點漬雜交法在華氏囊內可測到大量之病毒 DNA (10^{13} genome copies/g tissue) (Todd et al., 2002)，以上研究都顯示華氏囊具有高的病毒量，可見此病毒藉由糞便水平傳播的機率高。鴿子群居於鴿舍中藉由食入或吸入經由糞便汙染的器具或食物，而導致傳播機率高，並且此種環狀病毒對於化學及物理清潔劑的抗性強，使環狀病毒在環境中清除不易。

因為目前鳥類的環狀病毒皆無法利用細胞培養等 *in vitro* 的方式進行病毒分離及增殖，而主要以電子顯微鏡直接觀察病毒顆粒為重要的診斷工具利用，隨著 cloned DNA 及核苷酸序列分析能力的進步，目前最常使用的為聚合酶連鎖反應 (PCR)、原位雜交法 (*in situ* hybridization) 等方法來進行病毒的診斷 (Soike et al., 2001；Todd et al., 2002)。本研究選擇使用 PCR 及原位雜交法進行診斷之依據。在本研究中兩個病例皆利用 PCR 之不同引子進行檢測，並在許多臟器中皆有陽性之反應，但在利用原位雜交法進行病毒核酸偵測時，使用同樣之引子序列加上 DIG 標示所合成的探針，僅在少許臟器呈陽性反應，可能的原因包括：1. PCR 之敏感性較高，可偵測到 PiCV 的最低核酸濃度為 5.7×10^{-6} ng/ μ L，相較於 ISH 更加敏感；2. 病例的選擇包括年齡、鳥種、有無臨床症狀或採集的地點等皆可能影響其環狀病毒的檢測量；3. 探針的選擇也會影響雜交的特異性及敏感性，本研究中探針的製備以使用敏感性較高的 Digoxigenin，且探針的長度約 300 個核苷酸，不會因過短敏感性過高，而造成許多非特異性物質的鍵結，但因探針是利用 PCR 方式經由切膠純化之產物，其增幅的序列並未具高特異性，可能造成雜交時之特異性降低。改善方式可以將切膠純化之產物經分子選殖的方式利用定序方法確認為符合之核

酸序列，之後再抽取 plasmid 作為製備探針 PCR 之模板，其特異性高，可較準確的雜交在病毒核酸之特定序列上，提高雜交的成功率；4. 樣材臟器的選擇也是一項重點，因環狀病毒最常在免疫系統特別是華氏囊中檢測率為最高，但因本研究之兩個病例皆為成年鳥，華氏囊已萎縮無法進行採樣，僅在檢測率第二高的肝臟中有偵測到病毒核酸 (Soike et al., 2001)，並且第二個病例之 2 隻綠繡眼皆為外觀正常、健康之成鳥，雖然在 PCR 檢測中可見在一些臟器中有呈陽性反應，但 ISH 僅可在肝臟內看到極少的病毒量，故是否會造成鳥隻發病仍待觀察，但糞便中利用 PCR 呈現陽性反應，推測應仍可造成水平傳播病毒的可能。

另本研究利用多引子滾環式增幅法來進行 PiCV 全段基因的增幅以做為質體 DNA 陽性對照的保存，此方法優點為不需要昂貴的溫度循環裝置，只需在 37 °C 恆溫反應下即可進行，並且引子不需特別設計，也不需已知的核酸序列，以限制內切酶消化這些 DNA 產物，再從這些片段的 DNA 去比對為何種病毒的環形核酸即可。但在使用限制內切酶 *Not I* 時並非每個 PiCV 增幅的核酸序列皆可被切，推測此切位點位於 Capsid protein gene 上，其變異性較大，故並非每個 PiCV 增幅的核酸序列皆可被切下。

第三節 基因序列與親緣性分析之討論

在本研究中此 17 株由台灣北部及中部分離之家鴿環狀病毒由 ORF V1 及 ORF C1 之核酸序列相似性百分比分別為 96.5-100 % 及 90.6-100 %，以及其胺基酸序列相似性百分比分別為 90.3-100 % 及 92.4-100 %，可見家鴿在台灣地區流行之環狀病毒株其基因分型及多樣性變化並不高，表示其病毒之來源可能相當類似。而在本研究中 7 株野鴿分離株 ORF V1 之核酸序列相似性百分比雖然相近 (95.8-100 %)，但在 ORF C1 之核酸序列相似性百分比中 2009 年和 2010 年之分離株差異較

大，應屬於不同之感染來源，但因 2009 年僅一株病毒分離株不甚客觀，應多比較幾株相同年份之病毒分離株較能分辨其是否屬不同之感染來源。而在和其他國家的 14 株環狀病毒分離株相比，可得 ORF V1 之核酸序列相似性百分比為 94.3-99.6 %，其胺基酸序列相似性百分比 87.1-100 %，因 ORF V1 為核酸基因序列最保留的部分，並且 ORF V1 主要為轉譯出與 DNA 複製相關的 Rep 蛋白，故各株分離株之 ORF V1 核酸序列及胺基酸之相似性百分比皆高，且配合親緣性分析顯示雖然所有家鴿分離株分配在不同的 3 個分支中，而野鴿除了 2009 年之分離株在第 I 個支群外，其餘皆在第 III 個支群，但其差距相當小，表示其差異性不大，故此段保留之核酸序列區域適合當作 PCR 引子設計之區段，以作為環狀病毒診斷之用 (Todd et al., 2008)；而在和其他國家之 PiCV 分離株 ORF C1 核酸序列比較可得相似性百分比為 74.2-99.2 %，而胺基酸相似度為 73.2-99.8 %，因 ORF C1 主要為轉譯出外殼蛋白 (capsid protein) 故使得各株間變異性較大。其中此 17 株台灣分離株中大部分與比利時株 Belgium DQ 915957 及 DQ 915958 在核酸序列及胺基酸序列之相似性百分比皆較為接近，由此可以推測台灣之賽鴿可能由比利時引進佔大多數，而造成比利時株之環狀病毒在台灣散播。而依照親緣性樹狀圖分支亦可見家鴿在其中三個支群中皆有，表示其感染來源相當複雜，且可見北部及中部之同地區皆有不同之 PiCV 感染分型，如桃園縣之家鴿可在第 I、II、IV 支群中皆可見，可能與不同鴿舍引進不同來源之鴿子有關。而野鴿也分佈在其中三個支群中，第 I 個支群和其他家鴿較相近，第 II 支群為 2009 年所分離到之病毒株，和 2010 年的病毒株不相近，而第 III 個支群中包含 2010 年所分離到的相同的 4 株病毒株，可見野鴿除了經由家鴿傳播 PiCV 路徑可能存在之外，在自然界中也可能被其他來源之環狀病毒所感染而在野鴿群中水平散播。也因為 capsid proteins 胺基酸序列的變異性較大，故在選擇病毒株用以開發疫苗時必需考慮此段序列 (Todd et al., 2008)。

另本研究調查呈環狀病毒陽性之 26 株燕雀目鳥類中，可依 ORF V1 之胺基酸序列、胺基酸序列及親緣性分析大致分成與 PiCV、PDFDV、FiCV 及 RaCV 相似

之 4 個分支，並且這些不同分支中之燕雀目鳥類大多來自北、中、南、東部地區分離到之檢體，由此可推測在台灣地區最常見之燕雀目鳥類除了感染環狀病毒的陽性率高之外，其環狀病毒的感染來源也相當複雜，可能由不同種鳥類間互相傳播環狀病毒。不過本研究之採樣點為全省寵物鳥店之糞便拭子，有可能在這些鳥類被捕捉前已在大自然中和其他的鳥種自然的混合感染，亦或是在被捕捉後在狹窄、充滿各種鳥種之寵物鳥店中被污染的糞便、羽毛等而遭感染，需再針對不同地點之其他鳥種進一步作親緣性分析，才能較確定其感染環狀病毒的來源、時機或地點。本研究另外針對這些和鴿子環狀病毒較相似的燕雀目鳥類，挑出 5 株進一步將 ORF C1 和台灣地區野鴿分離株進行分析比對，可見其核酸序列及胺基酸序列相似性百分比為 79.7-100 % 與 78.2-100 %，其中 2010 年之麻雀分離株 Pm/207 與 2009 年之野鴿分離株完全相同，顯示麻雀具有感染鴿子環狀病毒之可能性；而在和其他國家之分離株比較時，可見這 5 株不同之燕雀目鳥種其 ORF C1 核酸序列相似性也不盡相同，如白頭翁分離株 Ps/1010 及斑文鳥分離株 Lp/863 與北愛爾蘭分離株有 99.2 % 及 99.6 % 之核酸相似性，綠繡眼分離株 Zj/841 與中國分離株較相近，而麻雀分離株 Pm/207 則與美國分離株較相近，顯示不同鳥種其感染鴿子環狀病毒的來源也不盡相同，可能來自野鴿或是其他感染 PiCV 之不同鳥種間互相感染，甚至至不同鴿舍附近進行搶食而遭受該鴿舍家鴿可能之感染來源。環狀病毒跨鳥種傳播的可能性在 2011 年 Li 等人提出相關研究顯示在雞肉組織樣材中分離出和鴿子環狀病毒有達 92 % 之基因相似性百分比 (Li et al., 2011)，此也間接證明本研究中燕雀目鳥類有感染其他鳥種環狀病毒之可能性存在。

綜合以上研究之結果得知，環狀病毒藉由糞便水平傳播在台灣之鴿子及常見的燕雀目鳥類之間有高的盛行率，且由核酸序列、胺基酸序列及親緣性分析可得其病毒感染來源相當複雜。鴿子的環狀病毒很可能由國外引進不顯性感染之環狀病毒種鴿、雛鴿或賽鴿，進而造成台灣地區之 PiCV 傳播，而依序列分析之結果可得台灣地區之感染來源相當類似，另也可能經由野鴿等野生鳥種之感染來源傳

播；而燕雀目鳥類之跨鳥種傳播經由本研究之核酸序列、胺基酸序列及親緣性分析發現有此現象之可能性，但仍需進一步針對其病毒之感染來源、感染時機或地點作更多研究以證明之。



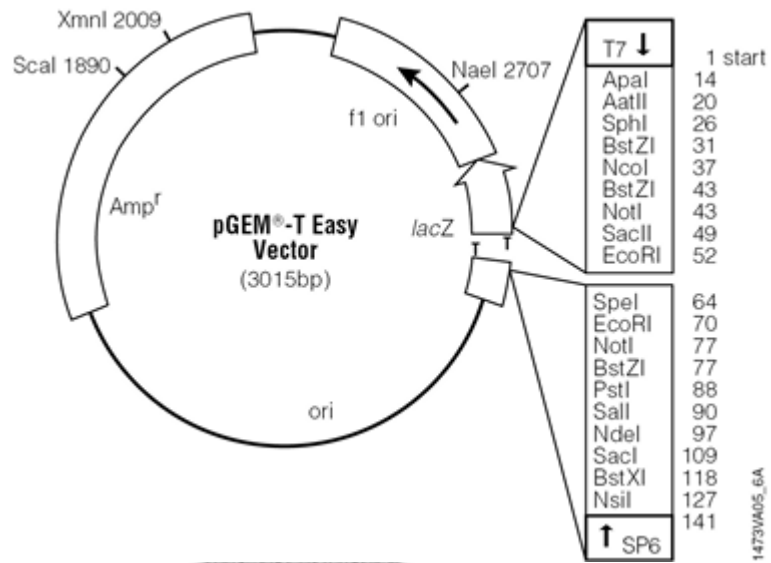


Figure 5. pGEM®-T Easy Vector.

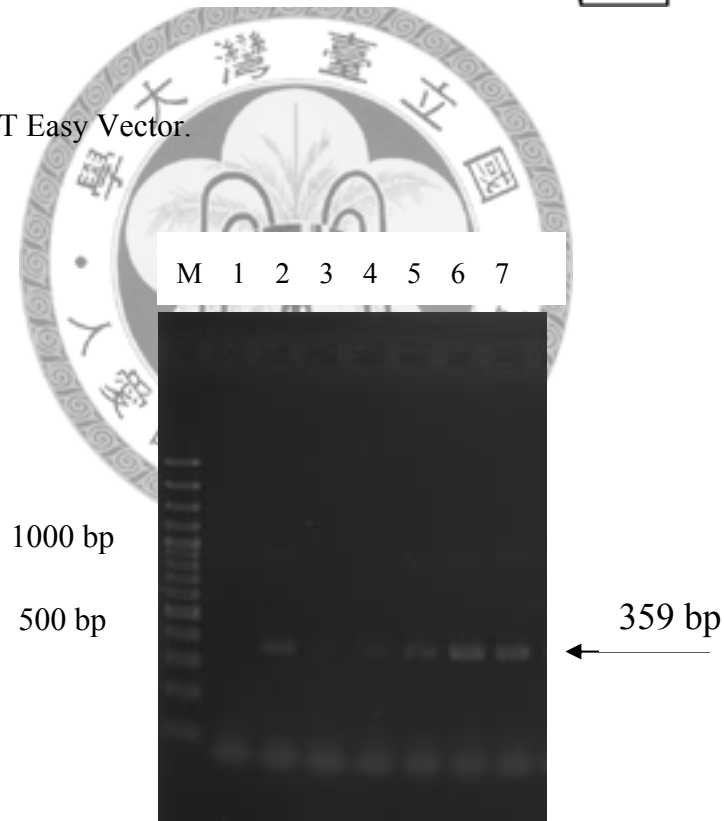


Figure 6. Polymerase chain reaction analysis of pigeon genome. Sequence of Cytochrome B was amplified by primer pair *cytB-s/cytB-as* (Hattermann et al., 2002). Lane 1: negative control ; Lane 2-7: positive samples of pigeon. M: 100 bp DNA ladder marker. 359 bp target PCR products are present.

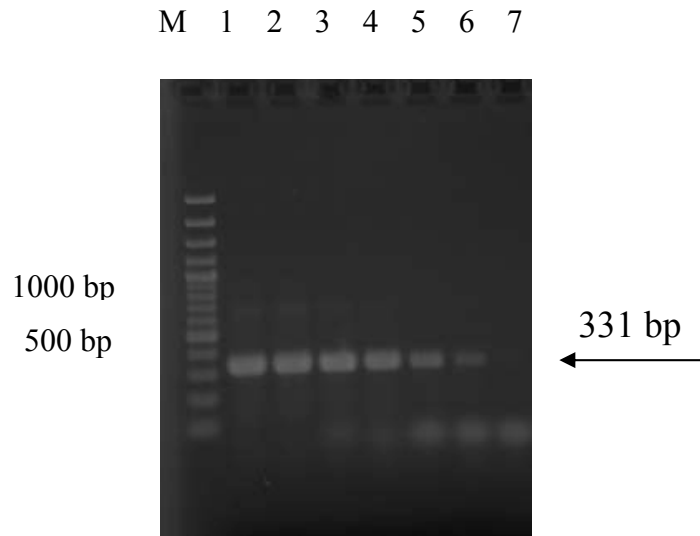


Figure 7. Polymerase chain reaction analysis of pigeon circovirus (PiCV) ORF V1. Sequence of PiCV was amplified by primer pair PiCV-V1-F/PiCV-V1-R (Todd et al., 2006). Lane 1-6: positive samples of pigeons ; Lane7: negative control. M: 100 bp DNA ladder marker. 331 bp target PCR products are present.

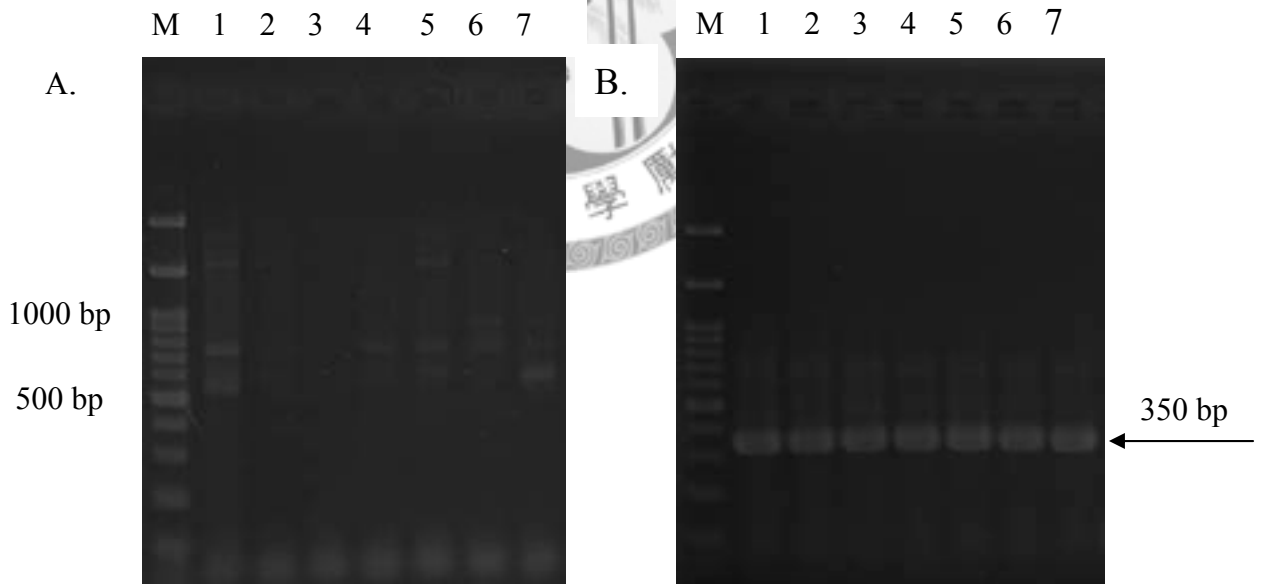


Figure 8. Nested broad-spectrum PCR analysis of bird circovirus ORF V1. Sequence of bird circovirus was amplified by primer pairs Cv-s/Cv-as and Cn-s/Cn-as (Halami et al., 2008). (A). PCR reactions were carried out in 46°C annealing temperature; (B). PCR reactions were carried out in 56°C annealing temperature. Lane 1-7: positive samples of birds. M: 100 bp DNA ladder marker. 350 bp target PCR products are present.

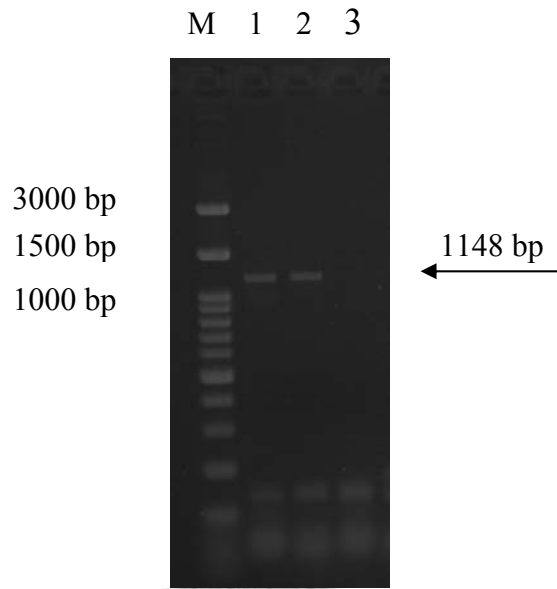
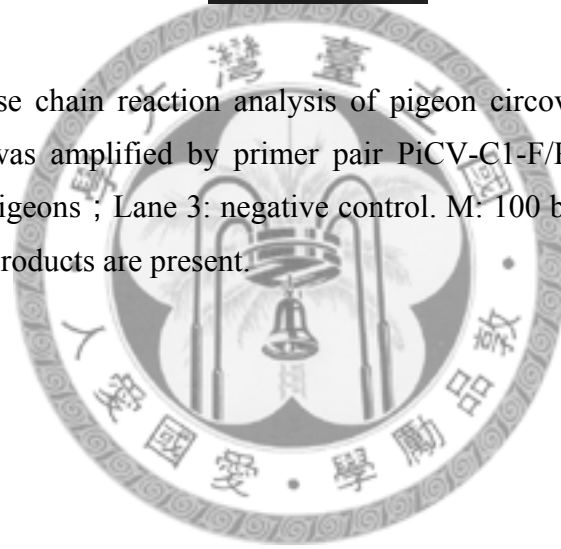


Figure 10. Polymerase chain reaction analysis of pigeon circovirus (PiCV) ORF C1. Sequence of PiCV was amplified by primer pair PiCV-C1-F/PiCV-C1-R. Lane 1-2: positive samples of pigeons ; Lane 3: negative control. M: 100 bp DNA ladder marker. 1148 bp target PCR products are present.



		Percent Identity																																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38		
Divergence	1	95.6	95.6	100.0	100.0	100.0	82.0	96.1	97.0	94.4	94.6	94.7	96.1	95.5	92.1	94.6	97.0	93.5	94.9	97.1	96.7	95.6	95.8	95.6	77.2	78.4	82.0	82.2	81.4	82.0	81.7	77.2	80.5	95.0	84.7	81.0	78.4	81.0	1	Wild pigeon/2010-12	
	2	3.9	100.0	95.5	95.5	95.5	82.5	97.3	95.8	96.5	96.8	96.7	97.3	97.1	94.1	93.8	96.5	95.5	97.0	96.4	95.9	98.0	97.9	98.0	77.5	78.2	83.1	82.9	81.1	83.1	82.5	75.7	79.9	97.1	96.5	81.0	75.1	81.0	2	Wild pigeon/2010-14	
	3	3.9	0.0	95.5	95.5	95.5	82.5	97.3	95.8	96.5	96.8	96.7	97.3	97.1	94.1	93.8	96.5	95.5	97.0	96.4	95.9	98.0	97.9	98.0	77.5	78.2	83.1	82.9	81.1	83.1	82.5	75.7	79.9	97.1	96.5	81.0	75.1	81.0	3	Wild pigeon/2010-15	
	4	0.0	3.9	3.9	100.0	100.0	82.0	96.1	97.0	94.4	94.6	94.7	96.1	95.5	92.1	94.6	97.0	93.5	94.9	97.1	96.7	95.6	95.8	95.6	77.2	78.4	82.0	82.2	81.4	82.0	81.7	77.2	80.5	95.0	84.7	81.0	78.4	81.0	4	Wild pigeon/2010-20	
	5	0.0	3.9	3.9	0.0	100.0	82.0	96.1	97.0	94.4	94.6	94.7	96.1	95.5	92.1	94.6	97.0	93.5	94.9	97.1	96.7	95.6	95.8	95.6	77.2	78.4	82.0	82.2	81.4	82.0	81.7	77.2	80.5	95.0	84.7	81.0	78.4	81.0	5	Wild pigeon/2010-27	
	6	0.0	3.9	3.9	0.0	0.0	82.0	96.1	97.0	94.4	94.6	94.7	96.1	95.5	92.1	94.6	97.0	93.5	94.9	97.1	96.7	95.6	95.8	95.6	77.2	78.4	82.0	82.2	81.4	82.0	81.7	77.2	80.5	95.0	84.7	81.0	78.4	81.0	6	Wild pigeon/2010-29	
	7	20.1	19.8	19.8	20.1	20.1	20.1	83.7	81.3	82.8	82.6	82.9	83.7	83.1	80.8	80.5	82.9	82.0	83.4	82.0	82.6	82.6	82.6	82.6	77.8	78.4	94.9	95.0	80.4	95.2	94.7	76.6	84.6	83.1	83.8	83.1	76.6	93.1	7	Wild pigeon/2009-1	
	8	3.4	2.6	2.6	3.4	3.4	3.4	18.3	18.3	18.3	97.9	97.4	97.7	100.0	98.3	95.5	94.4	97.3	96.8	98.3	97.1	97.0	98.0	97.7	98.0	78.7	79.2	84.4	84.6	82.2	84.4	83.8	77.9	81.6	98.5	98.5	83.1	77.5	83.1	8	Changhua/2010-33
	9	2.6	3.4	3.4	2.6	2.6	2.6	20.7	3.0	94.7	94.7	94.6	96.5	95.8	92.4	95.0	97.1	93.4	95.2	98.2	97.1	96.4	96.2	96.4	77.0	78.9	81.7	81.9	81.3	81.7	81.3	76.4	79.9	95.3	95.0	80.5	76.4	80.5	9	Hsinchu/2011-A537	
	10	5.0	3.6	3.6	5.0	5.0	5.0	19.5	2.0	4.6	97.0	97.3	97.9	97.9	97.0	92.9	95.6	97.0	98.5	95.5	95.3	96.8	96.5	96.8	78.5	78.2	83.5	83.7	82.0	83.4	82.9	76.3	80.8	98.6	98.2	82.0	76.0	82.0	10	Hsinchu/2011-A459	
	11	4.9	3.2	3.2	4.9	4.9	4.9	19.7	2.5	4.6	3.1	99.2	97.4	97.3	94.6	93.1	95.3	95.8	97.3	95.5	95.0	96.8	96.7	96.8	78.4	78.9	82.9	83.1	82.3	83.1	82.6	76.9	80.8	97.7	97.3	81.4	77.0	81.4	11	Miaoli/2010-107	
	12	4.7	3.4	3.4	4.7	4.7	4.7	19.3	2.2	4.7	2.8	0.8	97.7	97.6	94.9	92.9	95.5	96.1	97.6	95.3	95.2	97.0	96.7	97.0	78.5	78.7	83.4	83.5	82.6	83.1	82.6	77.5	80.8	98.0	97.6	81.4	77.0	81.4	12	Miaoli/2010-117	
	13	3.4	2.6	2.6	3.4	3.4	3.4	18.3	3.0	3.0	2.0	2.5	2.2	98.3	95.5	94.4	97.3	96.8	98.3	97.1	97.0	98.0	97.7	98.0	78.7	79.2	84.4	84.6	82.2	84.4	83.8	77.9	81.6	98.5	98.5	83.1	77.5	83.1	13	Taichung/2010-175	
	14	3.9	2.9	2.9	3.9	3.9	3.9	19.1	1.5	3.4	2.2	2.8	2.5	1.5	95.5	93.8	96.7	96.7	98.2	96.5	96.4	98.0	97.7	98.0	77.9	78.2	84.0	84.1	82.5	83.5	83.1	81.7	81.3	99.2	97.9	82.2	76.0	82.2	14	Taichung/2010-186	
	15	5.5	6.1	6.1	7.5	7.5	7.5	22.7	4.5	6.7	3.1	5.7	5.3	4.5	4.7	90.6	93.2	94.6	96.1	95.1	93.1	94.4	94.4	94.3	76.1	76.4	81.4	81.6	79.8	81.3	80.8	74.8	78.4	96.2	95.8	79.9	74.2	79.9	15	Taipei/2010-208	
	16	5.5	5.9	5.9	5.5	5.5	5.5	22.0	5.2	4.7	6.7	6.5	6.7	5.2	5.7	92	95.5	92.0	93.5	95.9	96.2	94.3	94.1	94.3	76.0	77.3	81.1	81.3	79.8	80.8	80.2	74.6	77.8	93.3	93.6	79.8	74.6	79.8	16	Taoyuan/2010-816	
	17	3.1	3.3	3.3	3.1	3.1	3.1	19.2	2.5	2.8	4.1	4.4	4.2	2.5	2.9	6.7	4.4	94.7	96.2	98.0	98.5	97.0	96.7	97.0	77.6	79.3	83.4	83.5	81.9	83.4	82.8	76.7	80.8	96.4	96.7	82.0	76.6	82.0	17	Taoyuan/2011-A492	
	18	6.0	4.5	4.5	6.0	6.0	6.0	20.4	2.9	5.6	2.9	4.2	3.9	2.9	3.3	5.5	7.7	90.0	94.4	94.3	95.5	95.8	95.7	77.2	77.6	82.8	82.9	81.0	83.1	82.3	76.6	79.6	97.4	96.7	82.5	75.1	82.5	18	Taoyuan/2011-A495		
	19	4.8	3.1	3.1	4.8	4.8	4.8	10.7	1.5	4.1	1.5	2.0	2.5	1.5	1.0	4.0	2.2	3.6	1.7	98.2	94.3	95.0	97.3	97.0	77.9	70.1	84.1	84.3	82.5	83.5	83.1	77.0	81.1	90.9	90.2	83.1	76.3	83.1	19	Taoyuan/2011-A501	
	20	2.8	3.3	3.3	2.8	2.8	2.8	20.1	2.5	1.4	4.1	4.1	4.2	2.5	2.9	6.5	4.0	2.2	5.0	3.6	98.0	97.1	97.0	97.1	77.2	79.2	82.5	82.6	81.3	82.8	82.2	76.6	80.1	96.2	95.9	81.6	76.1	81.6	20	Taoyuan/2011-A503	
	21	3.4	3.9	3.9	3.4	3.4	3.4	19.6	2.8	2.8	4.4	4.7	4.6	2.8	3.3	6.8	3.6	1.5	5.4	3.9	2.2	96.7	96.7	96.7	77.2	79.2	83.1	83.2	81.4	83.1	82.5	76.4	80.2	96.1	97.0	82.0	76.4	82.0	21	Yunlin/2010-65	
	22	3.7	2.0	2.0	3.7	3.7	3.7	19.7	1.8	3.0	3.2	3.2	3.1	1.8	2.0	5.8	5.4	2.8	4.2	2.8	2.5	3.1	99.7	100.0	77.2	77.6	83.2	83.1	82.2	83.1	82.6	76.1	80.4	97.6	97.1	81.4	76.1	81.4	22	Yunlin/2010-67	
	23	3.6	2.1	2.1	3.6	3.6	3.6	19.7	2.1	3.1	3.6	3.4	3.4	2.1	2.3	6.0	5.5	3.1	4.5	3.1	2.6	3.4	0.3	99.7	77.2	77.9	83.2	83.1	82.2	83.1	82.6	76.3	80.5	97.3	96.8	81.4	76.3	81.4	23	Yunlin/2010-75	
	24	3.7	2.0	2.0	3.7	3.7	3.7	19.7	1.8	3.0	3.2	3.2	3.1	1.8	2.0	5.8	5.4	2.8	4.2	2.8	2.5	3.1	0.0	0.3	99.7	77.2	77.9	83.2	83.1	82.2	83.1	82.6	76.1	80.4	97.6	97.1	81.4	76.1	81.4	24	Italy DQ915950
	25	28.4	26.5	26.5	28.4	28.4	28.4	25.6	24.9	27.7	25.0	25.2	25.0	24.9	25.9	28.5	29.5	27.3	26.6	25.4	27.7	28.0	26.9	26.9	26.9	94.0	78.1	78.4	81.4	78.5	78.5	75.2	79.3	78.9	78.9	78.4	74.0	78.4	25	China DQ090944	
	26	25.8	25.2	25.2	25.8	25.8	25.8	24.8	23.2	25.4	24.3	23.9	23.7	23.2	24.3	27.3	27.3	25.1	25.2	24.5	25.1	25.3	24.2	24.7	25.2	6.3	77.6	78.2	81.4	78.7	78.7	75.4	79.6	79.3	79.6	74.7	78.1	26	China DQ090945		
	27	19.9	19.1	19.1	19.9	19.9	19.9	5.3	17.3	20.1	18.5	19.3	18.7	17.3	17.9	21.7	21.2	18.6	19.5	17.7	19.6	19.0	18.9	18.9	18.9	25.3	25.3	25.8	99.1	81.6	96.5	94.7	76.4	85.5	84.0	84.4	94.0	76.4	94.0	27	France DQ915960
	28	19.7	19.3	19.3	19.7	19.7	19.7	5.2	17.1	19.9	18.3	18.1	18.5	17.1	17.7	21.5	21.0	18.4	19.3	17.5	19.3	18.8	19.1	19.1	19.1	24.8	25.0	0.9	82.0	96.7	94.9	76.4	85.6	84.1	84.6	94.0	77.0	94.0	28	Germany AF252610	
	29	20.9	20.6	20.6	20.9	20.9	20.9	22.7	19.4	20.8	20.0	19.6	19.2	19.4	19.4	23.1	23.2	20.6	21.5	19.4	21.1	21.2	19.8	19.8	19.8	20.7	20.9	20.3	82.3	81.6	76.9	92.0	81.6	76.9	92.0	81.6	76.9	92.0	29	Italy DQ915950	
	30	19.9	19.1	19.1	19.9	19.9	19.9	5.0	17.3	20.1	18.7	19.1	19.1	17.3	18.5	21.9	21.6	18.6	19.3	17.5	19.5	19.0	19.1	19.1	19.1	24.8	24.5	3.4	3.4	19.9	97.4	77.8	86.1	83.5	84.4	94.9	77.5	94.9	30	Northern Ireland AJ298229	
	31	20.2	20.1	20.1	20.2	20.2	20.2	5.3	18.1	20.7	19.5	19.9	19.1	19.3	22.7	22.4	19.4	20.3	18.5	20.3	18.5	20.3	19.8	19.8	19.8	19.8	25.0	24.6	5.3	5.2	21.0	2.5	77.2	84.6	83.1	82.0	76.4	94.7	31	Northern Ireland AJ298230	
	32	30.0	29.2	29.2	30.0	30.0	30.0	28.6	26.7	29.8	29.0	28.1	28.1	26.7	28.3	32.2	31.2	29.4	29.3	28.1	29.3	29.8	29.2	29.0	29.2	30.3	30.0	28.5	28.5	29.5	26.5	27.4	76.6	76.3	76.4	75.1	87.8	75.1	32	Australia DQ915959	
	33	24.2	24.8	24.8	24.2	24.2	24.2	18.3	22.4	24.8	23.3	23.3	23.3	22.4	22.7	26.7	26.6	23.8	25.2	23.1	24.2	24.7	23.9	23.7	23.9	23.8	23.8	17.1	16.9	8.0	16.1	17.3	31.2	81.6	81.6	85.8	76.0	85.8</			

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
Divergence	1	94.8	95.3	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	94.4	62.5	62.5	62.1	62.9	62.5	62.9	62.5	64.2	62.9	62.9	75.9	75.9	76.3	74.1	74.1	93.5	92.7	65.1	73.3	70.3	1	Pm/210-Taichung/2011
	2	5.4	99.6	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	93.5	62.1	62.1	60.3	63.8	62.1	62.5	63.4	63.7	63.4	63.4	73.3	73.3	75.0	73.7	73.7	93.1	92.2	66.8	72.4	70.7	2	Pm/209-Taichung/2011
	3	4.9	0.4	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	95.7	94.0	62.5	62.5	60.8	64.2	62.5	62.9	62.9	64.2	62.9	62.9	73.7	73.7	75.4	74.1	74.1	93.5	92.7	66.4	72.0	71.1	3	Pm/207-Taichung/2011
	4	5.9	6.8	6.3	100.0	100.0	100.0	100.0	94.8	100.0	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	4	Pm/953-Taipei/2010
	5	5.9	6.8	6.3	0.0	100.0	100.0	100.0	94.8	100.0	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	5	Ps/1009-Taichung/2010
	6	5.9	6.8	6.3	0.0	0.0	100.0	100.0	94.8	100.0	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	6	Ps/1010-Taichung/2010
	7	5.9	6.8	6.3	0.0	0.0	0.0	100.0	94.8	100.0	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	7	Lp/230-Yilan/2011
	8	5.9	6.8	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	94.8	100.0	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	8	Lp/232-Taipei/2011
	9	5.4	4.9	4.4	5.4	5.4	5.4	5.4	94.8	94.8	61.2	61.2	59.5	62.5	61.2	61.6	61.6	63.2	61.6	61.6	74.6	74.6	75.0	73.7	73.7	93.5	92.7	65.1	73.3	71.6	9	Lp/863-Taipei/2010	
	10	5.9	6.8	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	100.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	10	Zj/109-Pingtung/2011	
	11	5.9	6.8	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	0.0	62.1	62.1	61.6	62.9	62.1	62.5	62.1	63.7	62.5	62.5	75.0	75.0	75.9	74.6	74.6	96.6	96.1	63.8	74.1	71.6	11	Zj/841-Kaohsiung/2010
	12	45.5	47.2	46.3	45.7	45.7	45.7	45.7	48.8	45.7	45.7	100.0	99.1	91.8	100.0	97.4	95.7	97.6	96.1	96.1	64.7	64.7	69.8	71.1	70.7	65.9	63.4	94.8	65.5	69.8	12	Lp/861-Taipei/2010	
	13	45.5	47.2	46.3	45.7	45.7	45.7	45.7	48.8	45.7	45.7	0.0	99.1	91.8	100.0	97.4	95.7	97.6	96.1	96.1	64.7	64.7	69.8	71.1	70.7	65.9	63.4	94.8	65.5	69.8	13	Lp/864-Taipei/2010	
	14	47.1	48.8	47.9	47.2	47.2	47.2	47.2	50.4	47.2	47.2	0.9	0.9	91.4	91.1	96.6	94.8	96.7	95.3	95.3	64.2	64.2	69.0	70.3	69.8	65.5	61.2	94.0	65.1	69.0	14	Lp/894-Yilan/2010	
	15	46.6	45.8	45.0	46.8	46.8	46.8	46.8	48.3	46.8	46.8	8.7	8.7	9.2	91.8	93.1	92.2	92.5	92.7	92.7	70.7	70.7	70.7	70.7	70.7	63.8	64.2	91.4	66.4	69.0	15	Lp/895-Yilan/2010	
	16	45.5	47.2	46.3	45.7	45.7	45.7	45.7	48.8	45.7	45.7	0.0	0.0	0.9	8.7	97.4	95.7	97.6	96.1	96.1	64.7	64.7	69.8	71.1	70.7	65.9	63.4	94.8	65.5	69.8	16	Ps/913-Taichung/2010	
	17	44.0	45.6	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	47.2	44.8	44.8	2.6	2.6	3.5	7.2	2.6	98.3	98.1	98.7	98.7	65.1	65.1	70.3	70.7	70.7	65.5	62.9	95.3	65.9	67.7	17	Ps/143-Yilan/2011	
	18	44.8	44.0	44.8	45.6	45.6	45.6	45.6	47.3	45.6	45.6	4.4	4.4	5.4	8.2	4.4	1.7	97.6	97.8	97.8	64.2	64.2	70.3	70.7	70.7	65.5	62.9	94.8	65.9	67.7	18	Zj/851-Kaohsiung/2010	
	19	47.1	48.1	47.2	46.3	46.3	46.3	46.3	50.0	46.3	46.3	2.4	2.4	3.4	8.0	2.4	1.9	2.4	97.2	97.2	64.6	64.6	69.3	69.8	69.8	64.6	64.2	96.2	88.8	68.1	19	Lp/842-Kaohsiung/2010	
	20	44.0	44.0	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	47.2	44.8	44.8	4.0	4.0	4.9	7.7	4.0	1.3	2.2	2.9	100.0	64.2	64.2	69.8	69.8	69.8	65.5	62.9	94.8	65.5	66.8	20	Zj/846-Kaohsiung/2010	
	21	44.0	44.0	44.8	44.8	44.8	44.8	44.8	47.2	44.8	44.8	4.0	4.0	4.9	7.7	4.0	1.3	2.2	2.9	0.0	64.2	64.2	69.8	69.8	69.8	65.5	62.9	94.8	65.5	66.8	21	Zj/845-Kaohsiung/2010	
	22	29.2	33.2	32.5	30.5	30.5	30.5	30.5	31.3	30.5	30.5	47.0	47.0	48.6	45.8	47.0	47.0	48.9	47.9	48.8	48.8	100.0	75.9	76.7	76.7	73.7	74.6	67.2	88.8	68.1	22	Lp/258-Pingtung/2011	
	23	29.2	33.2	32.5	30.5	30.5	30.5	30.5	31.3	30.5	30.5	47.0	47.0	48.6	45.8	47.0	47.0	48.9	47.9	48.8	48.8	0.0	75.9	76.7	76.7	73.7	74.6	67.2	88.8	68.1	23	Lp/259-Pingtung/2011	
	24	26.8	28.7	28.0	26.2	26.2	26.2	26.2	28.9	26.2	26.2	45.2	45.2	46.8	44.1	45.2	44.6	44.7	45.0	45.4	45.4	26.2	26.2	97.0	97.0	75.4	78.4	70.3	72.8	81.9	24	Lp/897-Yilan/2010	
	25	30.0	30.6	30.0	28.1	28.1	28.1	28.1	30.8	28.1	28.1	41.9	41.9	43.4	43.0	41.9	42.7	42.8	43.0	44.4	44.4	26.2	26.2	3.1	99.6	72.0	78.0	70.3	72.4	83.2	25	Ps/1008-Taichung/2010	
	26	30.0	30.6	30.0	28.1	28.1	28.1	28.1	30.8	28.1	28.1	42.7	42.7	44.2	43.0	42.7	42.7	42.8	43.0	44.4	44.4	26.2	26.2	3.1	0.4	99.6	71.6	77.6	70.3	72.4	82.8	26	Pj/855-Kaohsiung/2010
	27	6.3	6.8	6.3	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	45.5	45.5	46.3	45.6	45.5	47.1	47.2	47.1	47.1	47.1	32.6	32.6	28.0	28.7	29.3	97.0	64.2	73.7	69.4	27	PiCV AF252610	
	28	7.7	8.2	7.7	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	44.7	44.7	46.3	44.1	44.7	46.3	46.3	46.2	46.3	46.3	31.2	31.2	25.5	26.1	26.7	3.1	99.6	64.2	73.7	72.4	28	PiCV AJ298229
	29	48.2	48.1	49.0	49.2	49.2	49.2	49.2	50.7	49.2	49.2	5.4	5.4	6.3	9.2	5.4	4.9	5.4	3.4	5.4	5.4	44.5	44.5	42.8	42.6	42.6	49.8	48.9	67.2	68.5	29	PBFDV AF080560	
	30	31.8	33.1	33.8	31.8	31.8	31.8	31.8	31.8	31.8	31.8	49.2	49.2	49.9	48.0	49.2	49.2	49.3	51.3	50.2	50.2	12.1	12.1	31.3	31.9	31.9	32.5	32.5	45.8	70.3	30	FiCV DQ845075	
	31	36.1	35.2	34.5	33.3	33.3	33.3	33.3	33.9	33.3	33.3	43.4	43.4	44.9	43.6	43.4	45.7	45.7	48.2	47.5	47.5	33.3	33.3	23.2	20.9	21.5	33.9	32.0	44.3	38.2	31	RaCV DQ146997	

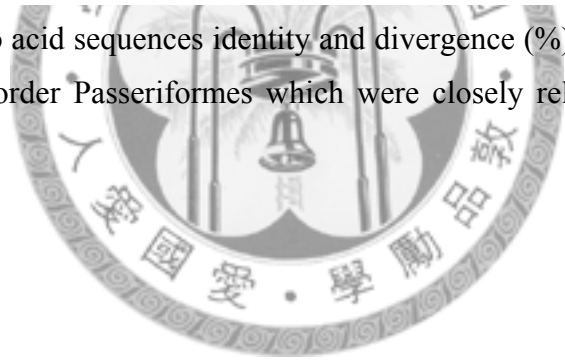
Figure 12. Nucleotide sequences identity and divergence (%) of the ORF V1 genes of circovirus of the order Passeriformes.

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26			
Divergence	1	81.7	80.5	99.6	97.5	82.6	81.7	81.7	82.6	82.6	82.6	97.5	79.7	81.3	97.5	97.9	81.7	99.2	98.3	77.6	85.9	83.4	83.4	96.7	80.5	96.7	1	Ps/1010-Taipei/2010	
	2	20.9	99.6	79.7	81.3	80.9	79.7	80.9	80.9	79.7	79.7	79.7	80.9	92.5	95.4	81.3	80.9	82.2	80.9	80.5	78.8	80.5	82.2	80.9	79.7	78.8	79.7	2	Zj/841-Kaohsiung/2010
	3	22.3	23.3	80.1	80.5	93.8	80.5	95.0	93.8	93.8	93.8	80.5	97.5	80.5	80.5	77.2	80.5	79.7	77.6	76.3	97.1	95.9	79.7	77.6	79.7	79.7	3	Lp/230-Yilan/2011	
	4	0.4	21.5	22.9	97.1	82.2	81.3	81.3	82.2	82.2	82.2	97.1	79.7	81.3	97.9	98.3	82.2	99.6	98.8	78.0	86.3	83.0	83.0	97.1	80.9	97.1	4	Lp/863-Taipei/2010	
	5	2.5	22.0	22.3	3.0	82.6	81.7	81.7	82.6	82.6	82.6	100.0	79.7	80.5	97.5	97.9	80.9	96.7	97.5	77.2	85.1	83.4	83.0	97.5	80.1	97.5	5	Pm/207-Taichung/2011	
	6	20.0	23.8	6.1	20.6	20.0	96.3	96.3	100.0	100.0	100.0	82.6	80.1	79.7	82.6	82.6	80.1	82.6	81.7	78.8	78.8	96.7	96.3	81.7	80.9	81.7	6	Wild pigeon/2010-12	
	7	21.1	22.1	4.7	21.7	21.0	3.8	100.0	96.3	96.3	96.3	81.7	81.7	81.3	81.7	81.7	79.7	81.7	79.7	80.9	78.8	78.0	97.9	96.7	80.9	79.3	80.9	7	Wild pigeon/2010-14
	8	21.1	22.1	4.7	21.7	21.0	3.8	0.0	96.3	96.3	96.3	81.7	81.7	81.3	81.7	81.7	79.7	81.7	80.9	78.8	78.0	97.9	96.7	80.9	79.3	80.9	8	Wild pigeon/2010-15	
	9	20.0	23.8	6.1	20.6	20.0	0.0	3.8	3.8	100.0																			

		Percent Identity																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
Divergence	1	█	79.3	83.8	100.0	96.6	84.5	83.9	83.9	84.5	84.5	84.5	96.6	77.0	79.9	97.7	98.3	79.9	100.0	98.3	78.7	82.2	85.1	85.1	96.6	82.2	96.6	1	Ps/1010-Taipei/2010
	2	24.2	█	79.2	79.3	78.2	78.2	79.3	79.3	78.2	78.2	78.2	78.2	90.8	95.4	79.9	79.3	78.2	79.3	78.2	76.4	78.2	79.9	78.7	77.6	76.4	77.6	2	Zj/841-Kaohsiung/2010
	3	18.4	24.4	█	83.8	83.8	97.1	97.7	97.7	97.1	97.1	97.1	83.8	81.5	81.5	83.8	83.8	76.9	83.8	83.2	78.6	77.5	98.8	97.7	83.2	79.2	83.2	3	Lp/230-Yilan/2011
	4	0.0	24.2	18.4	█	96.6	84.5	83.9	83.9	84.5	84.5	84.5	96.6	77.0	79.9	97.7	98.3	79.9	100.0	98.3	78.7	82.2	85.1	85.1	96.6	82.2	96.6	4	Lp/863-Taipei/2010
	5	3.5	25.8	18.3	3.5	█	84.5	83.9	83.9	84.5	84.5	84.5	100.0	77.0	78.7	97.7	98.3	78.7	96.6	97.1	77.0	81.0	85.1	84.5	97.7	81.6	97.7	5	Pm/207-Taichung/2011
	6	17.5	25.9	3.0	17.5	17.4	█	98.3	98.3	100.0	100.0	100.0	84.5	79.3	79.3	84.5	84.5	79.3	84.5	83.9	78.7	78.7	98.3	97.1	83.9	81.0	83.9	6	Wild pigeon/2010-12
	7	18.2	24.3	2.3	18.2	18.2	1.7	█	100.0	98.3	98.3	98.3	83.9	81.0	80.5	83.9	83.9	78.7	83.9	83.3	78.7	78.2	98.9	97.7	83.3	79.3	83.3	7	Wild pigeon/2010-14
	8	18.2	24.3	2.3	18.2	18.2	1.7	0.0	█	98.3	98.3	98.3	83.9	81.0	80.5	83.9	83.9	78.7	83.9	83.3	78.7	78.2	98.9	97.7	83.3	79.3	83.3	8	Wild pigeon/2010-15
	9	17.5	25.9	3.0	17.5	17.4	0.0	1.7	1.7	█	100.0	100.0	84.5	79.3	79.3	84.5	84.5	79.3	84.5	83.9	78.7	78.7	98.3	97.1	83.9	81.0	83.9	9	Wild pigeon/2010-20
	10	17.5	25.9	3.0	17.5	17.4	0.0	1.7	1.7	0.0	█	100.0	84.5	79.3	79.3	84.5	84.5	79.3	84.5	83.9	78.7	78.7	98.3	97.1	83.9	81.0	83.9	10	Wild pigeon/2010-27
	11	17.5	25.9	3.0	17.5	17.4	0.0	1.7	1.7	0.0	0.0	█	84.5	79.3	79.3	84.5	84.5	79.3	84.5	83.9	78.7	78.7	98.3	97.1	83.9	81.0	83.9	11	Wild pigeon/2010-29
	12	3.5	25.8	18.3	3.5	0.0	17.4	18.2	18.2	17.4	17.4	17.4	█	77.0	78.7	97.7	98.3	78.7	96.6	97.1	77.0	81.0	85.1	84.5	97.7	81.6	97.7	12	Wild pigeon/2009-1
	13	27.6	9.9	23.6	27.6	27.5	24.2	21.9	21.9	24.2	24.2	24.2	27.5	█	93.1	77.0	77.0	78.7	77.0	75.9	73.6	77.0	81.0	79.9	76.4	74.7	76.4	13	China DQ090945
	14	23.5	4.7	22.8	23.5	25.1	24.3	22.7	22.7	24.3	24.3	24.3	25.1	7.3	█	80.5	79.9	79.3	79.9	78.7	77.0	79.3	81.0	79.9	78.2	76.4	78.2	14	China DQ090944
	15	2.3	23.4	18.4	2.3	2.3	17.5	18.3	18.3	17.5	17.5	17.5	2.3	27.6	22.7	█	99.4	79.3	97.7	98.3	77.6	81.0	85.1	85.1	97.7	82.2	97.7	15	France DQ915960
	16	1.7	24.2	18.4	1.7	1.7	17.5	18.2	18.2	17.5	17.5	17.5	1.7	27.6	23.5	0.6	█	79.3	98.3	98.9	77.0	81.6	85.1	85.1	98.3	82.2	98.3	16	Germany AF252610
	17	23.5	25.9	27.6	23.5	25.1	24.2	25.0	25.0	24.2	24.2	24.2	25.1	25.1	24.4	24.3	24.3	█	79.9	78.7	75.9	94.8	78.2	78.2	78.7	75.3	78.7	17	Italy DQ915950
	18	0.0	24.2	18.4	0.0	3.5	17.5	18.2	18.2	17.5	17.5	17.5	3.5	27.6	23.5	2.3	1.7	23.5	█	98.3	78.7	82.2	85.1	85.1	96.6	82.2	96.6	18	Northern Ireland AJ298229
	19	1.7	25.8	19.1	1.7	2.9	18.2	19.0	19.0	18.2	18.2	18.2	2.9	29.3	25.1	1.7	1.2	25.1	1.7	█	77.0	81.0	84.5	84.5	97.1	81.0	97.1	19	Northern Ireland AJ298230
	20	26.8	29.1	25.4	26.8	27.7	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	27.7	35.5	30.1	26.8	27.6	35.3	26.8	27.6	█	77.0	79.9	79.3	76.4	86.8	76.4	20	Australia DQ915959	
	21	20.5	25.8	26.8	20.5	21.9	25.0	25.8	25.8	25.0	25.0	25.0	21.9	27.5	24.3	21.9	21.2	5.4	20.5	21.9	34.4	█	78.7	78.7	82.2	74.7	82.2	21	Belgium DQ915956
	22	16.8	23.4	1.2	16.8	16.7	1.7	1.2	1.2	1.7	1.7	1.7	16.7	21.9	21.9	16.8	16.8	25.8	16.8	17.5	23.6	25.0	█	98.9	84.5	80.5	84.5	22	Belgium DQ915957
	23	16.8	25.0	2.3	16.8	17.5	2.9	2.3	2.3	2.9	2.9	2.9	17.5	23.4	23.5	16.9	16.8	25.8	16.8	17.5	24.4	25.0	1.2	█	84.5	79.3	84.5	23	Belgium DQ915958
	24	3.5	26.6	19.1	3.5	2.3	18.2	19.0	19.0	18.2	18.2	18.2	2.3	28.4	25.9	2.3	1.7	25.1	3.5	2.9	28.6	20.4	17.5	17.5	█	80.5	100.0	24	USA DQ915962
	25	20.4	28.3	26.1	20.4	21.2	23.5	25.9	25.9	23.5	23.5	23.5	21.2	31.2	28.6	20.4	20.4	30.1	20.4	21.9	14.6	31.0	24.3	25.9	22.7	█	80.5	25	USA EU840176
	26	3.5	26.6	19.1	3.5	2.3	18.2	19.0	19.0	18.2	18.2	18.2	2.3	28.4	25.9	2.3	1.7	25.1	3.5	2.9	28.6	20.4	17.5	17.5	0.0	22.7	█	26	USA DQ915961
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26			

Figure 13.B. Amino acid sequences identity and divergence (%) of the ORF C1 genes of circovirus of the order Passeriformes which were closely related to PiCV in wild pigeons.



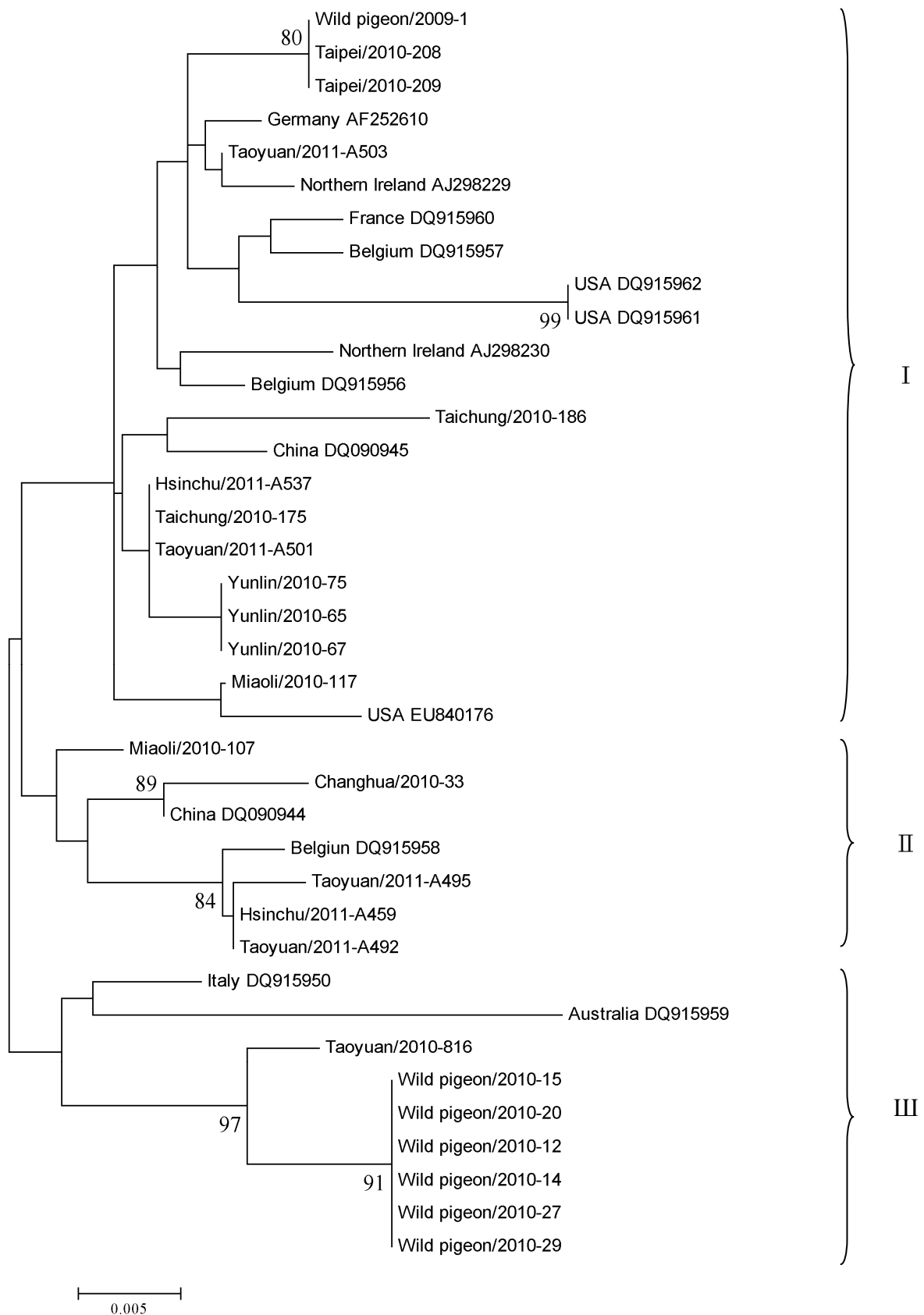


Figure 14. Phylogenetic relationship of the ORF V1 genes of PiCV. The tree was constructed by Neighbor-joining method with bootstrap of 1,000 replicates.

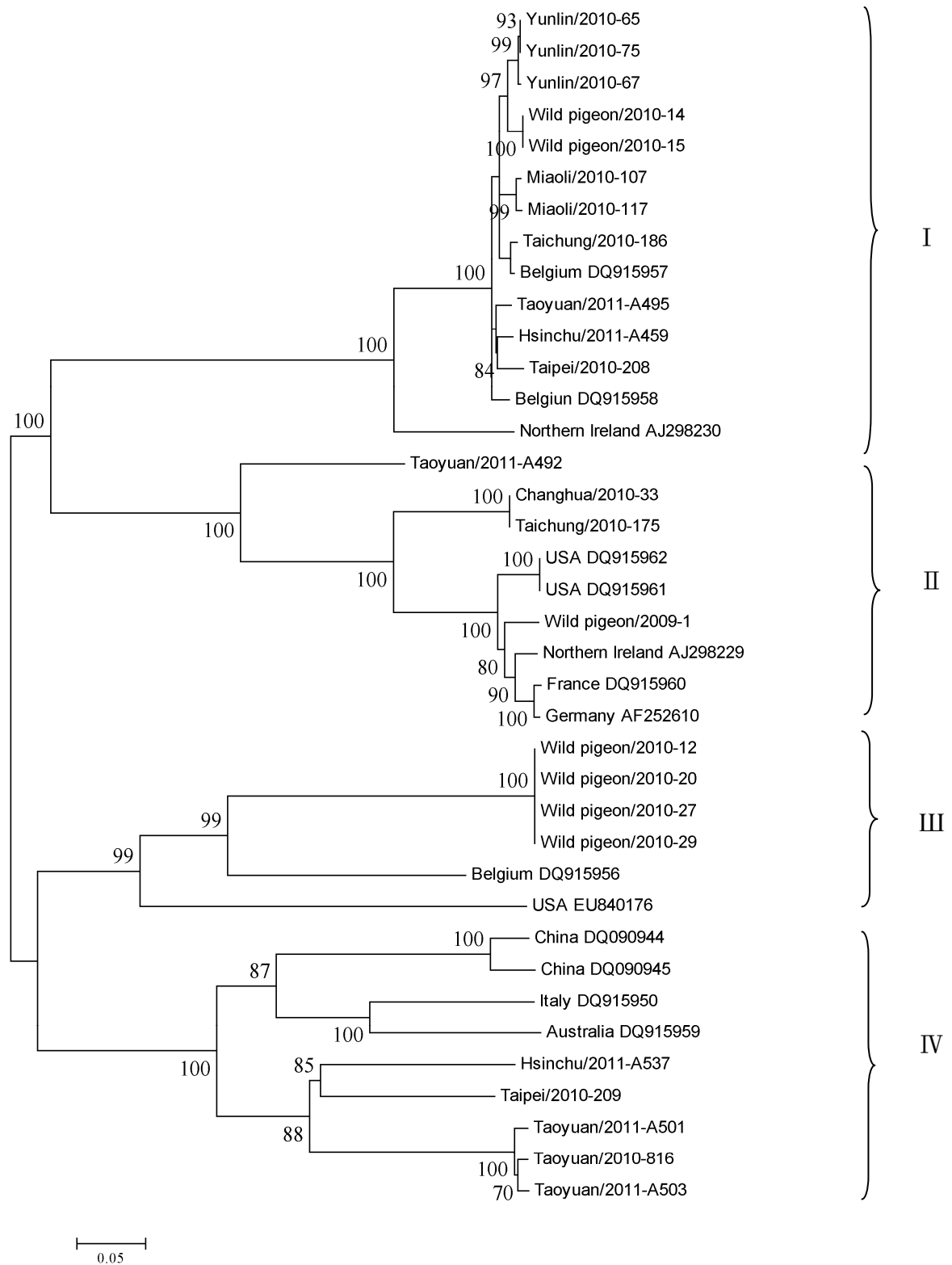


Figure 15. Phylogenetic relationship of the ORF C1 genes of PiCV. Analysis was based on nucleotides 1166-1826 of the ORF C1 genes. The tree was constructed by Neighbor-joining method with bootstrap of 1,000 replicates.

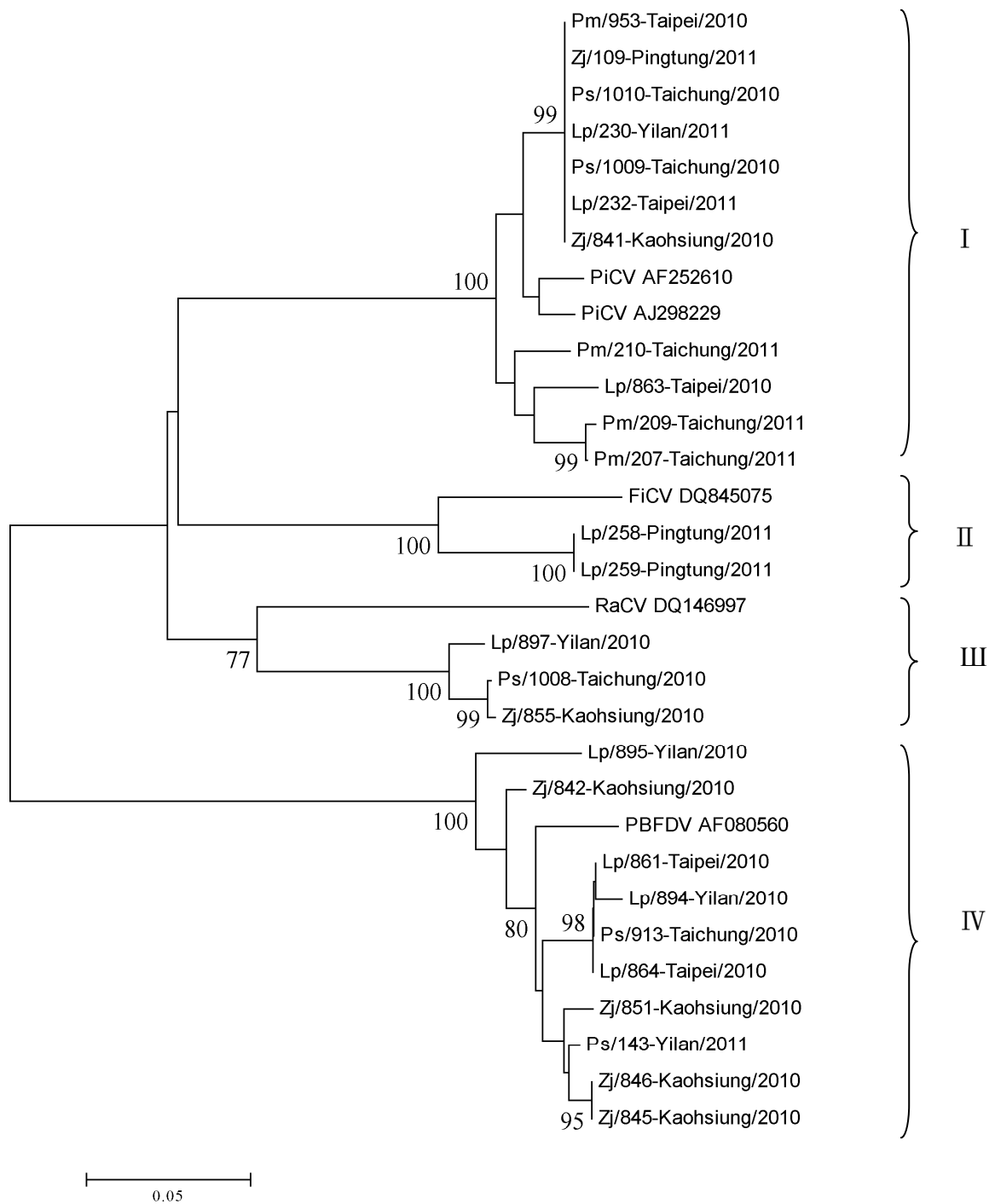


Figure 16. Phylogenetic relationship of the ORF VI genes of circovirus of the order Passeriformes. The tree was constructed by Neighbor-joining method with bootstrap of 1,000 replicates.

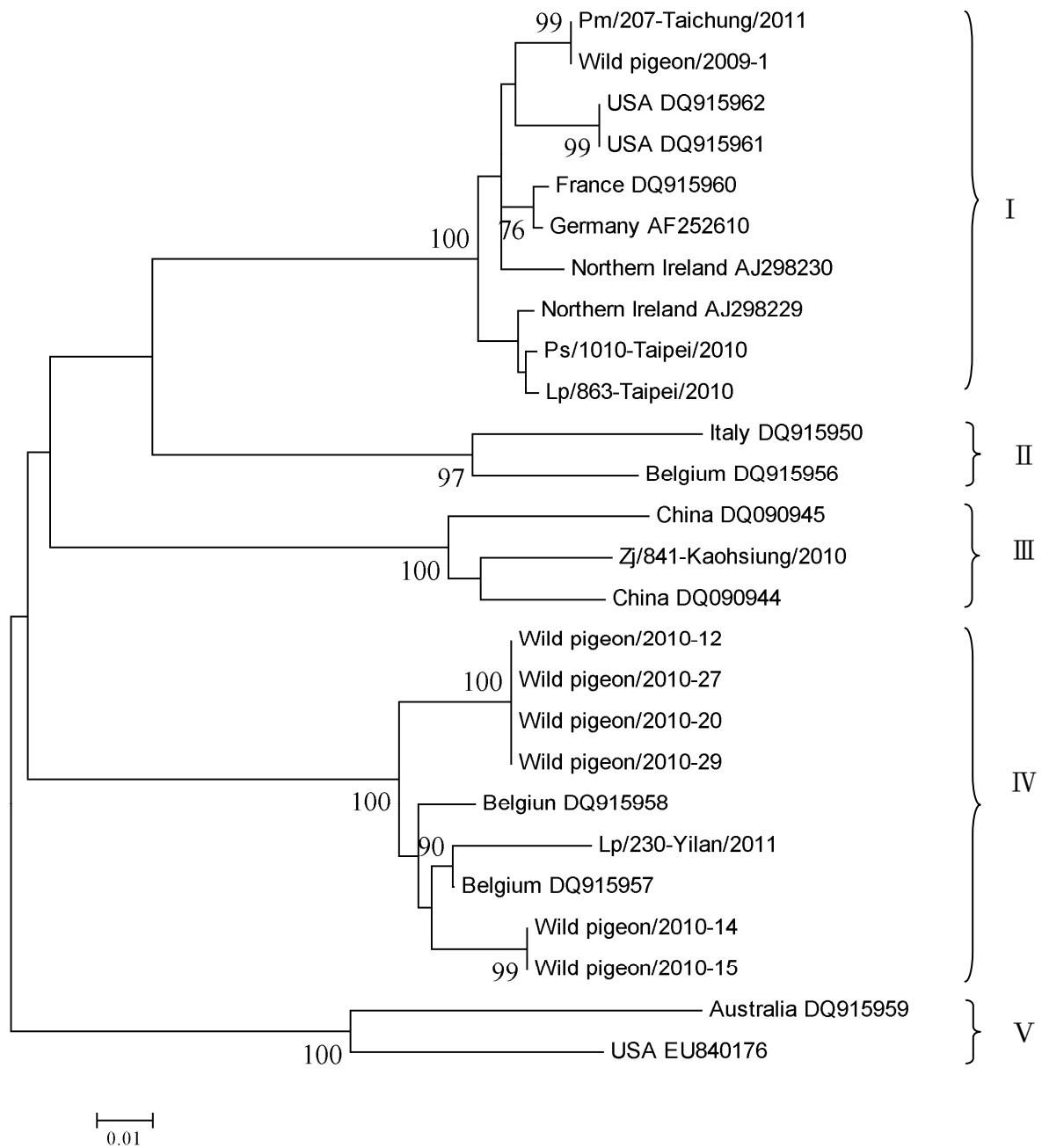


Figure 17. Phylogenetic relationship of the ORF C1 genes of circovirus of the order Passeriformes which were closely related to PiCV in wild pigeons. The tree was constructed by Neighbor-joining method with bootstrap of 1,000 replicates.

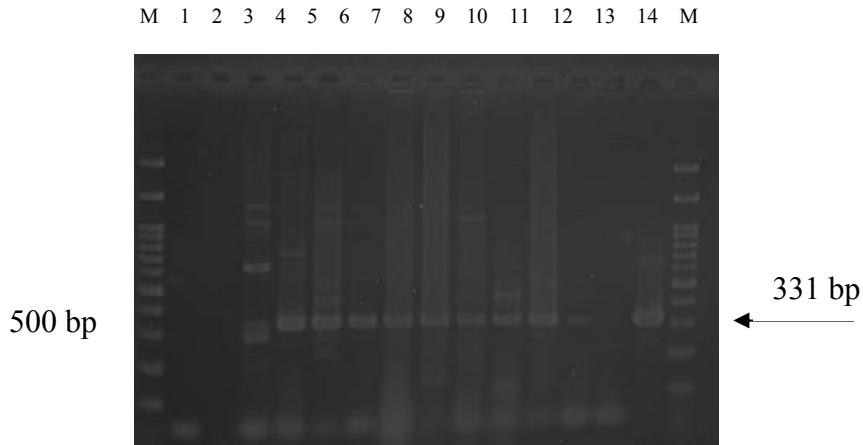


Figure 18. PCR detection of the pigeon circovirus (PiCV) in the various tissues and organs of a clinical ill adult pigeon with neurological syndrome. PCR analysis of PiCV ORF V1 by primer pair PiCV-V1-F/PiCV-V1-R (Todd et al., 2006). Lane 1: pharyngeal swab; lane 2: blood; lane 3: serum; lane 4: brain; lane 5: trachea; lane 6: lung; lane 7: crop; lane 8: gizzard; lane 9: liver; lane 10: kidney; lane 11: intestine; lane 12: cloacal swab; lane 13: negative control; lane 14: positive control. M: 100 bp DNA ladder marker.

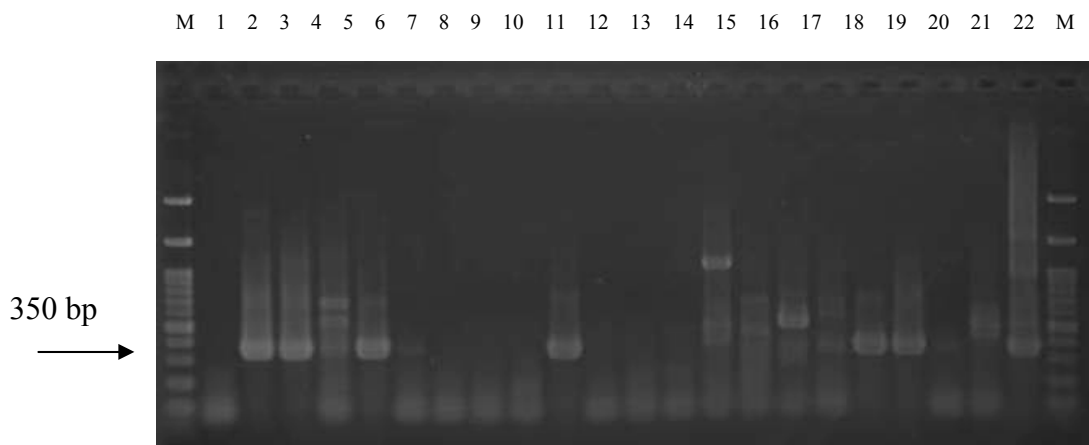


Figure 19. Nested broad-spectrum PCR detection of the avian circovirus in the various tissues and organs of two clinically healthy *Zosterops japonicas* (case a and b). Nested broad-spectrum PCR analysis of circovirus ORF V1 by primer pair Cv-s/Cv-as and Cn-s/Cn-as (Halami et al., 2008). Lane 1: negative control; lane 2: cloacal swab (a); lane 3: cloacal swab (b); lane 4: blood (a); lane 5: brain (a); lane 6: heart (a); lane 7: lung (a); lane 8: liver (a); lane 9: crop (a); lane 10: intestine (a); lane 11: kidney (a); lane 12: blood (b); lane 13: brain (b); lane 14: heart (b); lane 15: trachea (b); lane 16: lung (b); lane 17: liver (b); lane 18: spleen (b); lane 19: crop (b); lane 20: intestine; lane 21: kidney (b); lane 22: positive control. M: 100 bp DNA ladder marker.

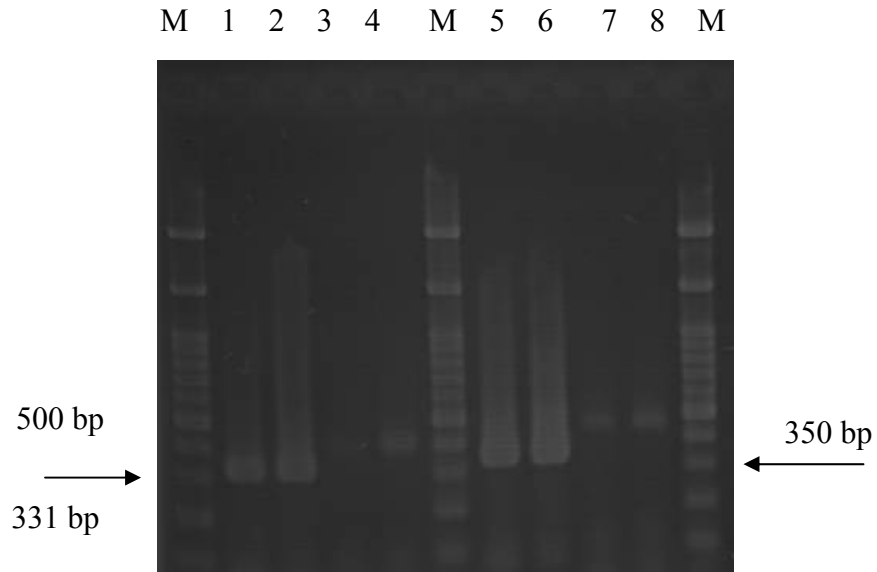


Figure 20. Electrophoresis results of DIG-labeling PCR for PiCV-V1 and Cn probe. Lane 1-2: Unlabeled PiCV-V1 PCR products ; lane 3-4: DIG-labeling PiCV-V1 PCR products, the labeled PCR products were larger than the unlabeled products in lane 1 and lane 2 (331 bp) ; lane 5-6: Unlabeled Cn PCR products ; lane 7-8: DIG-labeled Cn PCR products, the labeled PCR products were larger than the unlabeled products in lane 5 and lane 6 (350 bp). M: 100 bp DNA ladder marker.

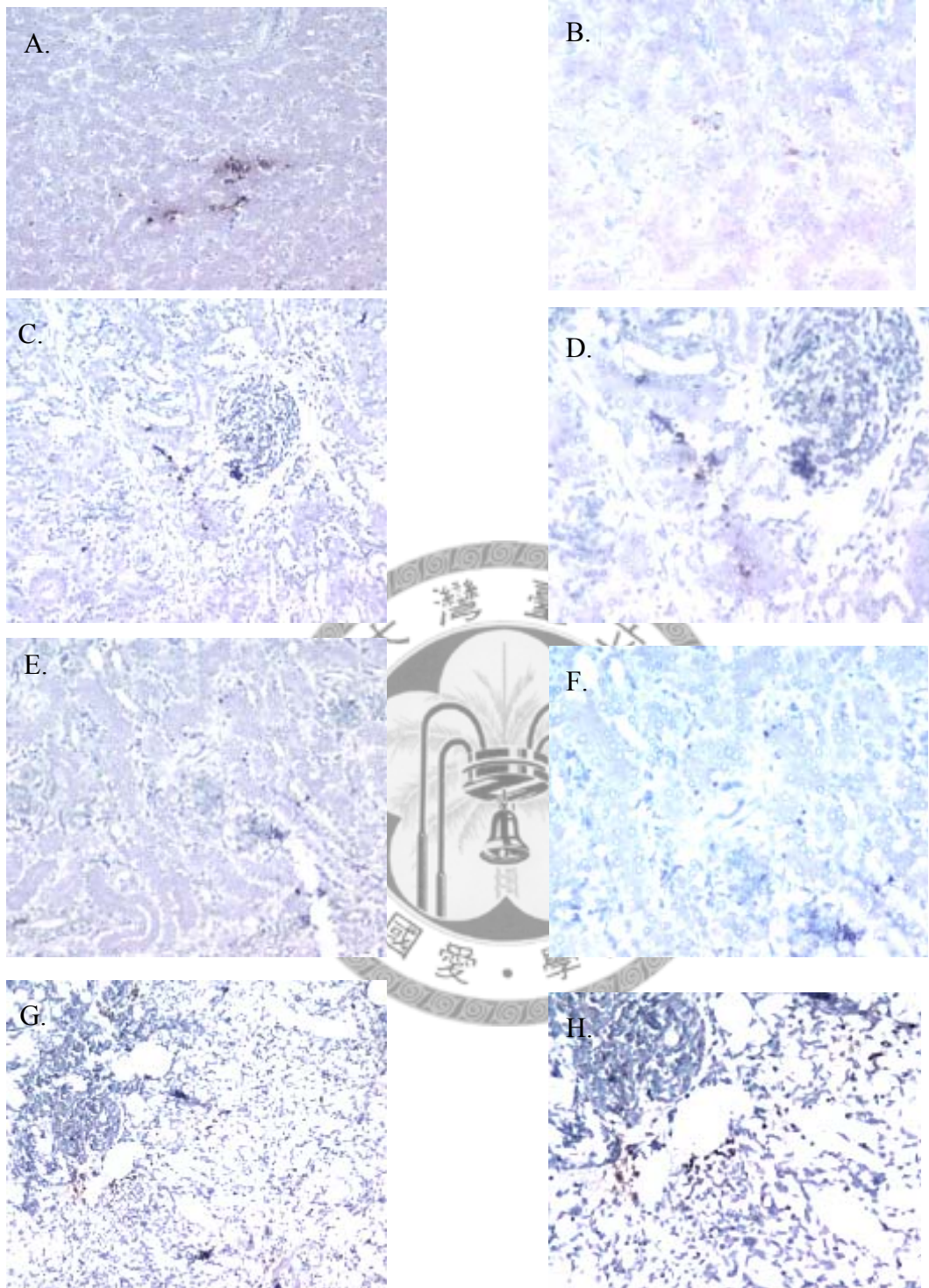


Figure 21. *In situ* hybridization for pigeon circovirus (PiCV) DNA in tissues from an adult pigeon with neurological syndrome. A, B: liver. A cluster of positive cells that appeared to be degenerate hepatocytes. C-F: kidney. Numerous positive cells in the interstitium. G, H: lung. Positive cells were present in the epithelium tissue.

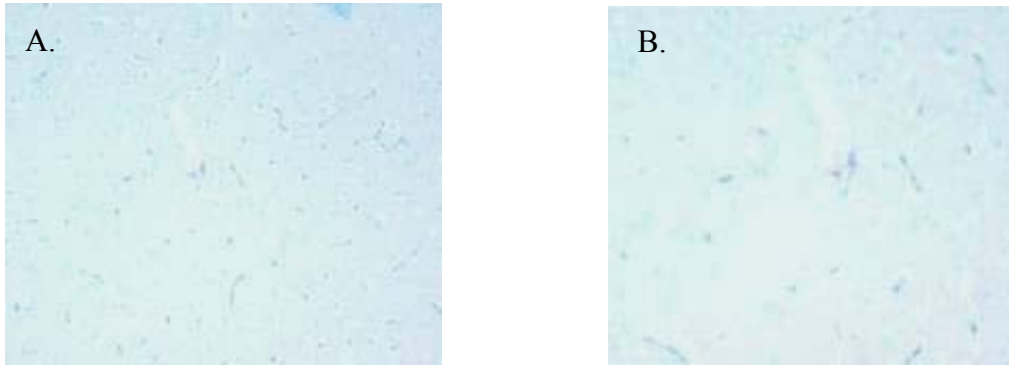


Figure 22. In situ hybridization for circovirus DNA in tissues from a healthy adult *Zosterops japonicus*. A, B: liver.

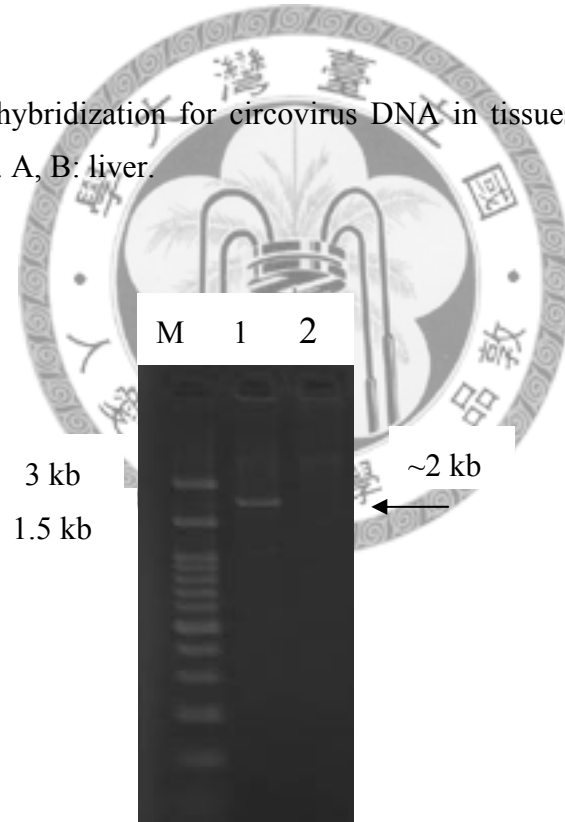


Figure 23. PCR products of the complete circular ssDNA genomes of PiCVs obtained after multiply primed rolling-circle amplification of PiCV and subsequent digestion using *Not* I. Lane 1 : Successfully digested by *Not* I and a band with a length of approximately 2 kb was visible. Lane 2: Unsuccessfully digested by *Not* I. M: 100 bp DNA ladder marker.

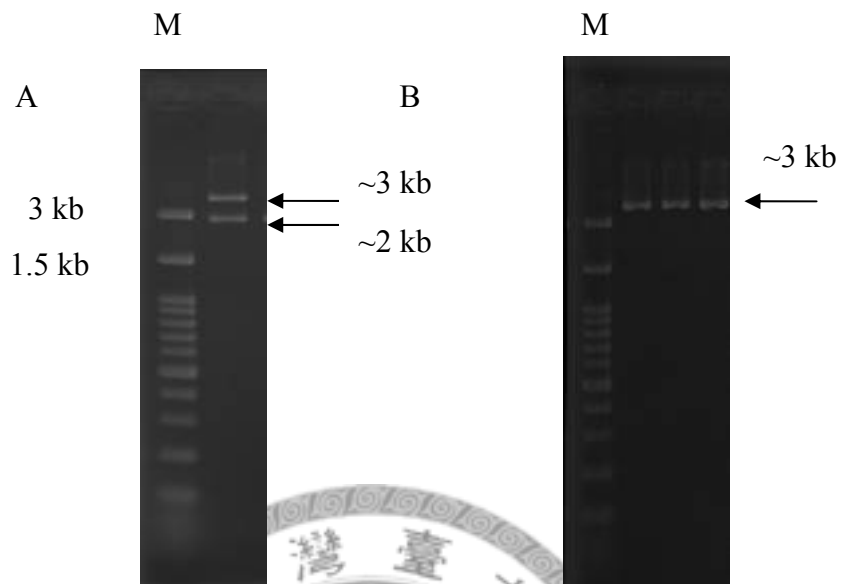


Figure 24. Amplification of PiCV from colonies were cleaved with *Eco*RI to confirm cloning with the correct insert size. (A). Successfully cloning and digested by *Eco*RI. Two bands with a length of approximately 2 kb (PiCV) and another length of approximately 3 kb (pGEM[®] -T Easy Vector) was visible. (B). Unsuccessfully cloning and only a length of approximately 3 kb (pGEM[®] -T Easy Vector). M: 100 bp DNAladder marker.

Table 1. Summarized information of 14 pigeon circoviruses (PiCVs) used for the sequence comparison in this study.

PiCV isolate	Accession no.	Country of origin	Reference (Year)
NI 7050	AJ298230	UK	Todd et al. (2001)
NI 9030	AJ298229	UK	Todd et al. (2001)
Ger 1	AF252610	Germany	Mankertz et al. (2000)
Bel 936	DQ915956	Belgium	Todd et al. (2002)
Bel 18	DQ915957	Belgium	Todd et al. (2002)
Bel 20	DQ915958	Belgium	Todd et al. (2002)
Fra A4042	DQ915960	France	Abadie et al. (2001)
Ita 4B	DQ915950	Italy	Franciosini et al. (2005)
US 93A	DQ915961	USA	Not available
US 002180	DQ915962	USA	Not available
SRK/US/01	EU840176	USA	Not available
Chi zj1	DQ090945	China	None available
Chi zj2	DQ090944	China	None available
Dove	DQ915959	Australia	Raidal and Riddoch (1997)

Table 2. Summarized information of circovirus of different bird species used for sequence comparison in this study.

Virus*	Accession no.	Country of origin	Reference (Year)
PBFDV	AF080560	Australia	Bassami et al. (1998)
FiCV	DQ845075	UK	Todd et al. (2007)
RaCV	DQ146997	Australia	Stewart et al. (2006)

* PBFDV= Psittacine Beak and Feather Disease Virus;

FiCV= Finch Circovirus;

RaCV= Raven Circovirus.

Table 3. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in racing and breeder pigeons in northern and central Taiwan.

City and County	Positive rate of lofts	Positive rate of racing pigeons	Positive rate of breeder pigeons	Positive rate of total pigeons
Taipei City and New Taipei City	17/17 (100 %)	106/171 (62 %)	15/22 (68.2 %)	121/193 (62.7 %)
Keelung	2/3 (66.7 %)	11/20 (55 %)	5/10 (50 %)	16/30 (53.3 %)
Taoyuan	3/3 (100 %)	25/30 (83.3 %)	2/10 (20%)	27/40 (67.5 %)
Hsinchu	5/6 (83.3 %)	44/75 (58.7 %)	0/15 (0%)	44/90 (48.9 %)
Miaoli	5/5 (100 %)	75/90 (83.3 %)		75/90 (83.3 %)
Taichung	9/10 (90 %)	100/145 (69 %)		100/145 (68.9 %)
Changhua	4/4 (100 %)	48/55 (87.3 %)		48/55 (87.3 %)
Nantou	1/1 (100 %)	6/20 (30%)		6/20 (30 %)
Yunlin	7/7 (100 %)	89/130 (68.5 %)		89/130 (68.5 %)
Total	53/56 (94.6 %)	504/736 (68.5 %)	22/57 (38.6 %)	526/793 (66.3 %)

Table 4. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in racing pigeons with/without clinical signs in northern and central Taiwan.

Healthy status of pigeons	PiCV positive rate in northern area	PiCV positive rate in central area	Total PiCV positive rate
Normal	166/271 (61.3 %)	247/357 (69.2 %)	413/628 (65.8 %)
Illness*	20/25 (80 %)	71/83 (85.5 %)	91/108 (84.3 %)
Total	186/296 (62.8 %)	318/440 (72.3 %)	504/736 (68.5 %)

*Clinical signs included anorexia, weight loss, diarrhea and poor race performance.

Table 5. Pigeon circovirus (PiCV) PCR-positive rate in wild pigeons in Taiwan.

Areas	Positive rate of wild pigeons
North area	32.2 % (94/292)
Central area	30.8 % (8/26)
South area	24 % (6/25)
East area	27.1 % (13/48)
Total	31 % (121/391)

Table 6. Circovirus PCR-positive rate of different bird species in this study.

Order	Species	Positive rate of birds
Psittaciformes	<i>Melopsittacus undulatus</i>	6/10 (60 %)
	<i>Agapornis roseicollis</i>	2/3 (33.3 %)
Columbiformes	<i>Streptopelia tranquebarica</i>	20/46 (43.5 %)
Passeriformes	<i>Zosterops japonicus</i>	102/111 (91.9 %)
	<i>Lonchura punctulata</i>	18/34 (52.9 %)
	<i>Pycnonotus sinensis</i>	17/83 (20.5 %)
	<i>Passer montanus</i>	4/20 (20 %)
Total		169/310 (54.5 %)

Table 7. All circovirus PCR-positive samples of different bird species in this study were sequenced of ORF VI and compared with other members of the family *Circoviridae*.

Different orders of samples	No. of positive samples			
	PBFDV	PiCV	FiCV	RaCV-like
Order Psittaciformes	8			
Order Columbiformes		20		
Order Passeriformes				
<i>Zosterops japonicus</i>	61	40		1
<i>Lonchura punctulata</i>	9	6	2	1
<i>Pycnonotus sinensis</i>	6	10		1
<i>Passer montanus</i>		4		
Total	84	80	2	3

第六章 參考文獻

王芄宣，2005。台灣地區鵝環狀病毒與鴨環狀病毒之 PCR 檢測、基因型分析與宿主特異性研究。國立中興大學碩士論文，台中。

王羣，2006。豬環狀病毒之概述。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

<http://vettech.nvri.gov.tw/Articles/ahm/334.html>

許志明，2006。APV 及 PBFDV 的分子分析與鸚鵡 APV 酵素免疫分析套組之開發。國立台灣大學碩士論文，台北。

Abadie, J., Nguyen, F., Groizeleau, C., Amenna, N., Fernandez, B., Guereaud, C., Guigand, L., Robart, P., Lefebvre, B., Wyers, M., 2001, Pigeon circovirus infection: pathological observations and suggested pathogenesis. *Avian Pathol* 30, 149-158.

Adair, B.M., 2000, Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev Comp Immunol* 24, 247-255.

Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.

Allan, G.M., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C.E., 1999, Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66, 115-123.

Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., McNulty, M.S., 1994, Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B* 41, 17-26.

Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R., 1998, Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 453-459.

Biagini, P., Uch, R., Belhouchet, M., Attoui, H., Cantaloube, J.F., Brisbarre, N., de Micco, P., 2007, Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* 88, 2696-2701.

- Bougiouklis, P.A., 2007, Avian circoviruses of the genus *Circovirus*: A potential trigger in Pigeon breeder's lung (PBL)/Bird fancier's lung (BFL). *Med Hypotheses* 68, 320-323.
- Chen, C.L., Chang, P.C., Lee, M.S., Shien, J.H., Ou, S.J., Shieh, H.K., 2003, Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathol* 32, 165-171.
- Cho, H.S., Kim, T.J., Lee, J.I., Park, N.Y., 2006, Serodiagnostic comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and surface plasmon resonance for the detection of antibody to porcine circovirus type 2. *Can J Vet Res* 70, 263-268.
- Claessens, J.A., Schrier, C.C., Mockett, A.P., Jagt, E.H., Sondermeijer, P.J., 1991, Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* 72 (Pt 8), 2003-2006.
- Clark, E.G., 1997, Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the American Association for Swine Practices* 28: 499-501.
- Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003, Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol* 77, 13036-13041.
- Cságota, A., Lorincz, M., Tombacz, K., Wladar, Z., Kovacs, E., Tuboly, T., 2011, Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes*.
- Daum, I., Finsterbusch, T., Hartle, S., Gobel, T., Mankertz, A., Korbel, R., Grund, C., 2009, Cloning and expression of a truncated pigeon circovirus capsid protein suitable for antibody detection in infected pigeons. *Avian Pathol* 38, 135-141.
- De Boer, G.F., Van Roozelaar, D.J., Moormann, R.J., Jeurissen, S.H., Wijngaard, J.C., Hilbink, F., Koch, G., 1994, Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathol* 23, 263-275.
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., Lasken, R.S., 2001, Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11, 1095-1099.
- Duchatel, J.P., Jauniaux, T., Smyth, J., Habsch, I., de Bournonville, M., Losson, B., Todd, D., 2010, Effect of a commercial paratyphus vaccine on the development of pigeon circovirus infection in young pigeons (*Columba livia domestica*). *J Avian Med Surg* 24, 107-114.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Curry, A., Smyth, J.A., Bustin, J.C., Vindevogel, H., 2005, New data on the transmission of pigeon circovirus. *Vet Rec* 157, 413-415.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Smyth, J.A., Bustin, J.C., Vindevogel, H., 2006, Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathol* 35, 30-34.

- Duchatel, J.P., Todd, D., Willeman, C., Losson, B., 2009, Quantification of pigeon circovirus in serum, blood, semen and different tissues of naturally infected pigeons using a real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 38, 143-148.
- Franciosini, M.P., Fringuelli, E., Tarhuni, O., Guelfi, G., Todd, D., Casagrande Proietti, P., Falocci, N., Asdrubali, G., 2005, Development of a polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon circovirus infection. *Avian Dis* 49, 340-343.
- Freick, M., Muller, H., Raue, R., 2008, Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. *J Virol Methods* 148, 226-231.
- Gelderblom, H., Kling, S., Lurz, R., Tischer, I., von Bulow, V., 1989, Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). *Arch Virol* 109, 115-120.
- Goldsmith, T.L., 1995, Documentation of passerine circoviral infection. *Proceeding of Association for Avian Veterinary* 16:349.
- Gough, R.E., Drury, S.E., 1996, Circovirus-like particles in the bursae of young racing pigeons. *Vet Rec* 138, 167.
- Halami, M.Y., Nieper, H., Muller, H., Johne, R., 2008, Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Res* 132, 208-212.
- Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., Mankertz, A., 2003, Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch Virol* 148, 2471-2480.
- Hattermann, K., Soike, D., Grund, C., Mankertz, A., 2002, A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J Virol Methods* 104, 55-58.
- Heath, L., Martin, D.P., Warburton, L., Perrin, M., Horsfield, W., Kingsley, C., Rybicki, E.P., Williamson, A.L., 2004, Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *J Virol* 78, 9277-9284.
- Islam, M.R., Johne, R., Raue, R., Todd, D., Muller, H., 2002, Sequence analysis of the full-length cloned DNA of a chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino acid sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49, 332-337.
- Johne, R., Fernandez-de-Luco, D., Hofle, U., Muller, H., 2006, Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *J Gen Virol* 87, 1189-1195.
- Koch, G., van Roozelaar, D.J., Verschueren, C.A., van der Eb, A.J., Noteborn, M.H., 1995, Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine* 13, 763-770.

- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010, Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol* 84, 1674-1682.
- Li, L., Shan, T., Soji, O.B., Alam, M.M., Kunz, T.H., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2011, Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J Gen Virol* 92, 768-772.
- Liu, C., Ihara, T., Nunoya, T., Ueda, S., 2004, Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *J Vet Med Sci* 66, 237-242.
- Liu, S.-N., Zhang, X.-X., Zou, J.-F., Xie, Z.-J., Zhu, Y.-L., Zhao, Q., Zhou, E.-m., Jiang, S.-J., 2010, Development of an indirect ELISA for the detection of duck circovirus infection in duck flocks. *Vet Microbiol* 145, 41-46.
- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D., 2000, Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145, 2469-2479.
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., Buhk, H.J., 1997, Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 71, 2562-2566.
- Marlier, D., Vindevogel, H., 2006, Viral infections in pigeons. *Vet J* 172, 40-51.
- McFerran, J.B., McNulty, M.S., Curran, W.L., 1978, Diagnosis of avian viral disease by electron microscopy. *Am J Vet Res* 39, 505-508.
- McNicol, A.M., Farquharson, M.A., 1997, In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* 182, 250-261.
- McNulty, M.S., 1991, Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol* 20, 187-203.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D., 1997, Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 1), 221-227.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2171-2179.
- Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., Hino, S., 1999, Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 73, 3582-3586.

- Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Birkenmeyer, L.G., Chalmers, M.L., Pilot-Matias, T.J., Dexai, S.M., 1999, Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3177-3182.
- Mysore, J., Read, D., Daft, B., 1995, Circovirus-like particles in finches (abstract). In *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Histopathology Section, Reno, NV, USA*, p.2.
- Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C., Paul, P.S., 2002, Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 33-40.
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D., 1998, Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 143, 1723-1744.
- Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1997, A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 92-97.
- Noteborn, M.H., de Boer, G.F., van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G., et al., 1991, Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol* 65, 3131-3139.
- Noteborn, M.H., Verschuere, C.A., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., 1998, Chicken anemia virus strains with a mutated enhancer/promoter region share reduced virus spread and cytopathogenicity. *Gene* 223, 165-172.
- Ortiz-Catedral, L., Kurenbach, B., Massaro, M., McInnes, K., Brunton, D.H., Hauber, M.E., Martin, D.P., Varsani, A., 2010, A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand. *Arch Virol* 155(4), 613-620.
- Pages-Mante, A., Saubi, N., Artigas, C., Espuna, E., 1997, Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anaemia virus. *Avian Pathol* 26, 721-729.
- Pass, D.A., Perry, R.A., 1984, The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust Vet J* 61, 69-74.
- Phenix, K.V., Weston, J.H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J.A., Todd, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R., 2001, Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the

- family Circoviridae. *J Gen Virol* 82, 2805-2809.
- Racine, S., Kheyar, A., Gagnon, C.A., Charbonneau, B., Dea, S., 2004, Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 736-741.
- Raidal, S.R., Cross, G.M., 1994, The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. *Avian Pathol* 23, 621-630.
- Rampin, T., Manarolla, G., Pisoni, G., Recordati, C., Sironi, G., 2006, Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Pathol* 35, 277-279.
- Raue, R., Schmidt, V., Freick, M., Reinhardt, B., Johne, R., Kamphausen, L., Kaleta, E., Müller, H., Krautwald-Junghanns, M.-E., 2005, A disease complex associated with pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathol* 34, 418-425.
- Rector, A., Tachezy, R., Van Ranst, M., 2004, A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *J Virol* 78, 4993-4998.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, P.D., Steffens, W.L., 3rd, Latimer, K.S., 1989, Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 171, 83-88.
- Roy, P., Dhillon, A.S., Lauerman, L., Shivaprasad, H.L., 2003, Detection of pigeon circovirus by polymerase chain reaction. *Avian Dis* 47, 218-222.
- Schmidt, V., Schlomer, J., Luken, C., Johne, R., Biere, B., Muller, H., Krautwald-Junghanns, M.E., 2008, Experimental infection of domestic pigeons with pigeon circovirus. *Avian Dis* 52, 380-386.
- Scott, A.N., Beckett, A., Smyth, J.A., Ball, N.W., Palya, V., Todd, D., 2006, Serological diagnosis of goose circovirus infections. *Avian Pathol* 35, 495-499.
- Scullion, F.T., Scullion, M.G., 2007, Pathologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with "young bird sickness". *J Avian Med Surg* 21, 1-7.
- Shivaprasad, H.L., Chin, R.P., Jeffrey, J.S., Latimer, K.S., Nordhausen, R.W., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., 1994, Particles resembling circovirus in the bursa of Fabricius of pigeons. *Avian Dis* 38, 635-641.
- Shivaprasad, H.L., Hill, D., Todd, D., Smyth, J.A., 2004, Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathol* 33, 525-529.
- Smyth, J., Soike, D., Moffett, D., Weston, J.H., Todd, D., 2005, Circovirus-infected geese studied by in situ hybridization. *Avian Pathol* 34, 227-232.

- Smyth, J.A., Carroll, B.P., 1995, Circovirus infection in European racing pigeons. *Vet Rec* 136, 173-174.
- Smyth, J., Todd, D., Scott, A.N., Twentman, C.M., Gavier-Widen, D., 2006, Identification of circovirus infection in three species of gull. *Vet Rec* 159 (7): 212-214.
- Smyth, J.A., Weston, J., Moffett, D.A., Todd, D., 2001, Detection of circovirus infection in pigeons by in situ hybridization using cloned DNA probes. *J Vet Diagn Invest* 13, 475-482.
- Soike, D., 1997, Circovirus infections in pigeons. *Tierarztl Prax* 25, 52-54.
- Soike, D., Hattermann, K., Albrecht, K., Segales, J., Domingo, M., Schmitt, C., Mankertz, A., 2001, A diagnostic study on columbid circovirus infection. *Avian Pathol* 30, 605-611.
- Soike, D., Kohler, B., Albrecht, K., 1999, A circovirus-like infection of geese related to a runtting syndrome. *Avian Pathol*, 28:199-202.
- Steenhuisen, W., Jagt, H.J.M., Schrier, C.C., 1994, The use of a live attenuated CAV vaccine in breeder flocks in the Netherlands. *Proceeding of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Chicken Anaemia*, Rauischolzhausen, Germany: University of Giesen, pp. 482-497.
- Stewart, M.E., Perry, R., Raidal, S.R., 2006, Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathol* 35, 86-92.
- Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., Mishiro, S., 2000, Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 145, 979-993.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974, Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 226, 153-167.
- Todd, D., 2000, Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review. *Avian Pathol* 29, 373-394.
- Todd, D., 2001a, Genome Sequence Determinations and Analyses of Novel Circoviruses from Goose and Pigeon. *Virology* 286, 354-362.
- Todd, D., 2004, Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet Microbiol* 98, 169-174.
- Todd, D., Duchatel, J.P., Bustin, J.C., Scullion, F.T., Scullion, M.G., Scott, A.N., Curry, A., Ball, N.W., Smyth, J.A., 2006, Detection of pigeon circovirus in cloacal swabs: implications for diagnosis, epidemiology and control. *Vet Rec* 159, 314-317.

- Todd, D., Duchatel, J.P., Weston, J.H., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Moffett, D.A., Smyth, J.A., 2002, Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infections. *Vet Microbiol* 89, 1-16.
- Todd, D., Fringuelli, E., Scott, A., Borghmans, B., Duchatel, J., Shivaprasad, H., Raidal, S., Abadie, J., Franciosini, M., Smyth, J., 2008, Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Res Vet Sci* 84, 311-319.
- Todd, D., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Curran, W., Allan, G.M., Lukert, P.D., Latimer, K.S., Steffens, W.L., 3rd, McNulty, M.S., 1991, Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch Virol* 117, 129-135.
- Todd, D., Scott, A.N., Fringuelli, E., Shivaprasad, H.L., Gavier-Widen, D., Smyth, J.A., 2007, Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol* 36, 75-81.
- Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L., Lavazza, A., 2001b, Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathol* 30, 321-325.
- Uzun, O., Yilmaz, D.K., Sunter, A.T., Erkan, L., 2011, The Prevalence of “Pigeon Breeder’s Disease” in a Turkish City and Review of the Literature. *Lung*.
- Vielitz, E., Voss, M., 1994, Experiences with a commercial CAV-vaccine. *Proceeding of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Chicken Anaemia*, Rauischolzhausen, Germany: University of Giesen, pp. 465-481.
- Woods, L.W., Latimer, K.S., Barr, B.C., Niagro, F.D., Campagnoli, R.P., Nordhausen, R.W., Castro, A.E., 1993, Circovirus-like infection in a pigeon. *J Vet Diagn Invest* 5, 609-612.
- Woods, L.W., Latimer, K.S., Niagro, F.D., Riddell, C., Crowley, A.M., Anderson, M.L., Daft, B.M., Moore, J.D., Campagnoli, R.P., Nordhausen, R.W., 1994, A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). *J Vet Diagn Invest* 6, 156-164.
- Woods, L.W., Latimer, K.S., 2000, Circovirus infection of nonsittacine birds. *J Avian Med Surg* 14(3), 154-163.
- Yuasa, N., 1992, Effect of chemicals on the infectivity of chicken anaemia virus. *Avian Pathol* 21, 315-319.
- Yuasa, N., Tanihuchi, T., Yoshida, I., 1979, Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis* 23: 366-385.
- Zhang, Z., Lu, C., Wang, Y., Wang, S., Dai, D., Chen, Z., Fan, H., 2011, Molecular characterization and epidemiological investigation of Pigeon circovirus isolated

in eastern China. J Vet Diagn Invest 23, 665-672.

