

臺灣禽類副黏液病毒核酸序列檢測與分析

劉玉彬^{1,2}、鄭明珠¹、李敏旭¹、陳麗璇¹、陳燕萍¹、李淑慧¹、蔡向榮^{1,2*}

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所

²國立台灣大學獸醫專業學院

摘要 以往台灣對於禽類副黏液病毒 (APMV) 之研究僅著重在第一血清型的新城病，為了瞭解各個型別 (APMV-1 ~ 9) 副黏液病毒在國內家禽飼養場、本地留鳥及季節遷徙候鳥、國外輸入及走私禽鳥、觀賞鳥等族群實際之帶毒情形，本研究以核酸序列檢測與分析進行之。共鑑定出 54 株 APMV，其中 15 株 APMV-1、1 株 APMV-2、17 株 APMV-4、8 株 APMV-6、另有 13 株 APMV-7。將第七血清型 AHRI-33 分離株核酸序列全長定序後，與 GenBank 資料庫內 APMV-7 標準株之胺基酸相似度僅 36~73%，推論應為第七血清型下的新亞型病毒株。另進行 APMV-1 融合蛋白基因親緣樹分析，15 株 APMV-1 分屬第 I、II、VI 及 VII 等四種基因型，其中一株可歸類於另一新基因型。本研究發現除了新城病之外，還有至少四型的副黏液病毒存在於台灣的禽鳥間，結果可供副黏液病毒對於禽鳥潛在性影響之流行病學研究用。

關鍵詞：禽類副黏液病毒；新城病

緒言

禽類副黏液病毒 (avian paramyxovirus; APMV) 在分類上歸屬副黏液病毒科 (paramyxoviridae)，病毒顆粒直徑約 100-500 nm，具雙層脂質所構成的封套，其基因體為一大小約 15-17 kb，不分節之單鏈負股 RNA，可表現至少六個主要病毒蛋白，包括核鞘蛋白 (nucleocapsid protein; NP)、磷酸化蛋白 (phosphoprotein; P)、基質蛋白 (matrix protein; M)、融合蛋白 (fusion protein; F)、血球凝集素-神經胺酶 (hemagglutinin-neuramidase; HN) 及大蛋白 (large protein; L)。禽類副黏液病毒的分型，主要是利用血球凝集抑制 (hemagglutination inhibition, HI) 試驗來測定彼此之間的抗原相關性，而分成九種血清型，即禽類副黏液病毒血清第一型 (APMV-1)

到血清第九型 (APMV-9) [3,4]。禽類副黏液病毒群中 APMV-1、APMV-2、APMV-3 與 APMV-6 已經證實與家禽疾病具相關性 [7,11,18,19]，APMV-4 與 APMV-9 在鴨子的飼養場中亦有分離到，但並未造成顯著之疾病 [5,14]。APMV-7 在火雞造成呼吸道疾病與產蛋下降，而 APMV-5 與 APMV-8 則主要分離自野鳥，目前尚未於家禽中分離到 [13]。

台灣本地禽類副黏液病毒研究概況：鄭等 (1997) 為了解台灣地區在 1995 年初，發生雞新城病大流行之後，其他野鳥及玩賞鳥是否被波及或有帶毒的可能，共檢測 242 件糞便或共泄腔拭子，最後由鸚鵡及鴿子分離到兩株強毒型 NDV [1]。另一篇論文則利用反轉錄聚合酶鏈反應來診斷與鑑定自紅鳩與鴿子分離到的 APMV [2]。而 2001 年，張等發表全球第一篇 APMV-6 亞型定出基因序列全長之文獻，並由序

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

列分析結果指出禽類副黏液病毒應在副黏液病毒亞科下，另設一個新的屬[5]。

禽類副黏液病毒為家禽重要的病原，廣佈於世界各處兩百多種禽鳥體內。此病毒包括九種血清型，不同血清型對於禽鳥造成嚴重死亡或輕微不具病徵等不同之臨床症狀，世界各國自以往便十分重視此一病原群，並不斷進行相關之研究及調查。台灣對於這方面之研究，目前除了在雞新城病的專研外，其餘禽類副黏液病毒的探討幾近困乏。為了解禽類副黏液病毒第一型至第九型於台灣禽鳥之感染情形，本研究擬針對國內家禽飼養場、本地留鳥及季節遷徙候鳥、國外輸入及走私禽鳥、觀賞鳥等檢體，進行禽類副黏液病毒之血清型別分布調查。

材料及方法

病毒株來源

本研究病毒株來自四個部份：（一）家畜衛生試驗所之陸禽及水禽病性鑑定檢體：由各縣市防治所後送之全國家禽飼養場病例。（二）家畜衛生試驗所之野鳥監測計畫：由野鳥學會、南投特有生物保育中心、野生動物急救站等進行候鳥樣材的採集，材料來源包括由野鳥學會以鳥網捕捉法進行繫放所得之候鳥之排遺及棲地排遺採樣，各地野生動物急救站收容的傷病或死亡野鳥的排遺或屍體。（三）家衛所及台灣大學「輸入禽鳥及其產品之高病原性家禽流行性感冒監測」科技計畫：檢體來源為動植物防疫檢疫局各檢疫站之輸入禽鳥採集樣本及查獲之走私禽鳥檢體。（四）台灣大學「寵鳥與寵鳥店鳥類之家禽流行性感冒病毒監測」科技計畫：檢體來源涵蓋本地留鳥及寵物鳥，檢測鳥種包括紅鳩（224件）、白頭翁（139件）、麻雀（113件）、白尾八哥（5件）及朱頸斑鳩（4件），共計485件。上述檢體經雞胚胎蛋進行病毒分離後，若雞胚胎尿囊液具有雞紅血球凝集特性，且在電顯中可看到類似副黏液病毒之病毒顆粒時，則繼續下述檢測。

病毒 RNA 之萃取

使用Roche的MagNA Pure Compact全自動核酸萃取機萃取病毒RNA。取200 μ L病毒液，利用

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I萃取病毒RNA，最後萃取出100 μ L RNA，置於-80℃待用。

反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

（一）APMV-1之RT-PCR檢測：核酸抽取物2 μ L加入反應試劑：35 μ L ddH₂O、5 μ L 10X PCR Reaction Buffer、APMV-1融合蛋白基因特異性引子2 μ L（由本所李敏旭副研究員設計提供）、5 μ L的dNTP Mix、0.6 μ L DNA Polymerase、0.2 μ L鳥類骨髓母細胞症病毒（AMV）反轉錄酶、0.2 μ L核糖核酸酶抑制劑，反應總體積為50 μ L。將上述配製好之反應液放入熱循環反應器中進行反應。反應條件為42℃ 40分鐘。95℃ 2分鐘。95℃ 30秒，50℃ 40秒，72℃ 50秒，總共35個循環，最後72℃ 7分鐘。增幅後產物及核酸標幟物放入2%瓊脂凝膠中，在盛裝TAE緩衝溶液之水平式電泳槽內，以100伏特電壓進行電泳。電泳完成後，以溴化乙錠染色10分鐘，再將電泳膠片置於紫外燈觀察箱上觀察。若檢體出現符合預期產物大小（約724 bp）之條帶，將增幅產物送交生物技術公司（MB Mission Biotech）進行核酸定序。（二）APMV-2 ~ APMV-9 random priming RT-PCR檢測：以上述APMV-1特異性引子進行RT-PCR反應若為陰性，表示檢體可能為非第一型的二到九型APMV，則使用hexamers random primer套組（PROTECH），在相同之試劑配置下，進行42℃ 40分鐘。95℃ 2分鐘。95℃ 40秒，45℃ 2分鐘，65℃ 2分鐘，總共35個循環，最後72℃ 7分鐘的核酸增幅。增幅產物若出現大於500 bp之條帶，則將產物純化再以TOPO TA cloning kit（Invitrogen）進行基因轉殖，利用載體上之M13 primer進行挑選後，送交生物技術公司（MB Mission Biotech）進行核酸定序。（三）AHRI-33之全長定序：利用random primer增幅出大於500 bp之條帶後，再利用genome walking方式定出中間之核酸序列後，再利用5'端Rapid Amplification of cDNA Ends（RACE）及3'端RNA Ligation方式，所得PCR產物

由TOPO TA Cloning選殖後送交定序，定序結果利用DNASTAR軟體分析。

核酸序列比對及親緣樹分析

將定序所得之核酸序列以DNASTAR (DNASTAR Inc) 分析軟體的Edit Seq程式編輯核酸序列後，以SeqMan程式將各個片段之DNA組合成完整的核酸序列。所建立之完整序列與GenBank上其他副黏液病毒的核酸序列全長或各蛋白質的胺基酸序列，利用Megalign程式，以Clustal方法比對各病毒間的序列，可畫出親緣樹及計算各病毒間相異性，及利用Mega 4程式計算親緣樹中各節點的bootstrap值。APMV各血清型標準株之NCBI資料庫之accession numbers：APMV-1, AF077761；APMV-2, EU338414；APMV-3, EU403085；APMV-4, FJ177514；APMV-5, GU206351；APMV-6, EF569970；APMV-7, FJ231524；APMV-8, FJ215863；APMV-9, EU910942。

病毒分離株之血清學診斷

以核酸定序方法無法鑑定病毒之血清型別時，則將分離株及其高免血清送義大利之新城病及家禽流行性感官國際參考實驗室 (International Reference Laboratories for Newcastle disease and avian influenza)，利用血球凝集抑制試驗進行血清型別之鑑定。

結果

由台灣家禽飼養場、野鳥、輸入禽鳥及寵物鳥等四種不同來源檢體所分離之54株禽類副黏液病毒，利用分子生物學及血清學進行血清型別區分，共鑑定出APMV-1、2、4、6及7等5種血清型，各病毒株之編號、檢體來源、鳥種、分離年份、血清型別及切割位序列整理於表1。其中以APMV-4最多 (n=17)，其次為APMV-1 (n=15)、APMV-7 (n=13)、APMV-6 (n=8) 及APMV-2 (n=1)。各血清型別中以APMV-1感染宿主範圍最廣，在各種檢體來源中均可分離到，包括家禽飼養場 (n=7)、野鳥 (n=6)、寵物鳥 (n=1)、輸入鳥類 (n=1)。檢測結果整理如表2。

家禽飼養場 APMV 檢測

共鑑定出8株禽類副黏液病毒，除一株為第六血清型外 (AHRI-9，中興張伯俊老師所分讓由田間分離到之病毒株)；其餘7株均為血清型一型，分別為AHRI-10、12分離自鵝場，AHRI-43、68來自鴿子飼養場的檢體，而AHRI-70、71及72則均為雞場之病毒株。

野鳥 APMV 檢測

檢體主要來自於家禽流行性感官候鳥帶毒監測計畫，共鑑定出30株病毒，其中以APMV-4最多 (n=17)，其次為APMV-6 (n=7) 及APMV-1 (n=6)。在這30株不同血清型別APMV中，除了一株APMV-1分離自鸛科鳥種外，其餘29株APMV病毒均分離自鴨科野鳥。其中APMV-1共分離到6株，融合蛋白切割位在113~116的鹼性胺基酸均為兩個，117位為Leucine，不具有ND強毒株3個鹼性胺基酸以上及117位為Phenylalanine之特徵。

輸入禽鳥 APMV 檢測

在2009年由美國輸入的鴿子中檢出一株PPMV-1 (AHRI-34)，及新加坡輸入的鸚鵡檢出一株APMV-2 (AHRI-35)。第一血清型AHRI-34的融合蛋白切割位序列為¹¹²RRKKR↓F¹¹⁷。

寵物鳥 APMV 檢測

寵物鳥檢測主要為紅鳩、白頭翁及麻雀等三種鳥種，分別佔檢體量之46%、29%及23%。雖然白頭翁及麻雀之檢體數加總超過五成，然而卻未分離到任何APMV，所有14株寵物鳥APMV均分離自紅鳩，APMV陽性率約6%。此14株APMV血清型別除AHRI-1為第一血清型外，其餘13株之核酸序列具高度相似性，以AHRI-33為代表株在NCBI資料庫的BLAST比對結果雖然最接近APMV-7，但其六段基因全長與GenBank的APMV-7/dove/Tennessee/4/75之胺基酸序列僅有36~73%之相似度，其比對結果如表3所示。該代表株之血球凝集素-神經胺酶及融合蛋白兩種抗原表現蛋白的基因之親緣樹分析結果如圖1及圖2所示，均與APMV-7較接近，但仍有顯著之差異。而經由3' 及5' RACE (Rapid amplification of cDNA end) 方式定出之核酸序列全長為16,914

nt, 較已發表完整序列中第七血清型15,480 nt為長。因為在核酸序列分析上, 無法鑑定其型別, 所以將病毒株及製備好之雞隻高免血清經主管機關防檢局同意後, 送義大利的OIE參考實驗室進行血清型鑑定。該實驗室進行血球凝集抑制試驗結果顯示, 分離株AHRI-33抗原與第七血清型標準抗血清之HI力價為1024倍, 其餘8型之HI力價均為16倍以下, 因此判定為第七血清型。

APMV-1 分離株之融合蛋白基因親緣樹分析

將上述家禽飼養場、野鳥、輸入及寵物鳥等四種來源所分離之15株APMV-1病毒, 經以RT-PCR增幅並解讀出包括切割位序列之融合蛋白基因, 再將所得之序列進行親緣樹分析結果如圖3。15株APMV-1分屬第I、II、VI及VII等四種基因型。其中野鳥所分離到之APMV-1, 除AHRI-67分離株外, 其餘5株(AHRI-24、44、46、59、63)均為第I基因型, 為傳統野鳥分離株所屬之基因型。在雞場主動監測檢體中分離到的AHRI-72之親緣樹分析結果亦歸類於第I基因型。AHRI-67病毒株在融合蛋白基因親緣樹分析中不歸屬於任一基因型, 其基因體序列全長在NCBI資料庫的比對結果與NDV之相似度僅70%, 推論此病毒為APMV-1之新分類基因型。主動監測雞場分離株(AHRI-71)之融合蛋白基因序列相近於ND疫苗株B1、Lasota等第II基因型, 推論應該是來自於田間ND的活毒疫苗。親緣樹分析中, 第VI基因型鴿源的APMV-1共有4個分離株(AHRI-1、34、43、68), 美國輸入鴿子分離到的AHRI-34較接近於義大利dove分離到的PPMV-1, 與台灣鴿子飼養場分離的AHRI-43與-68及寵物鳥紅鳩AHRI-1雖相鄰卻不同分支。兩株由鵝場分離到的AHRI-10、12, 及一株由雞場分離到的AHRI-70, 均屬於台灣ND目前主要流行的第VII基因型。其中鵝源的AHRI-10、12在親緣樹分析中與鄰近中國之鵝源副黏液病毒(goose-origin paramyxovirus, GPMV)核酸序列相近。2012年由雞場分離到之ND病毒株(AHRI-70)融合蛋白切割位序列為RRKKR↓F, 顯示為強毒株(velogenic strain), 和近年台灣分離ND病毒株TW 08-406、tw-2000、tw-96p及tw-95-2之相似度分別為92.8

%、79.1%、93.8%及88.5%。

討論

台灣過往禽鳥的病毒帶毒調查中, 常在各種檢體(包括家禽飼養場、野鳥、輸入禽鳥及寵物鳥)中分離到APMV, 但往往受限於缺乏完整標準抗原及標準抗血清, 而無法鑑定各血清型別在禽鳥間的分布情形, 也無法探究其流行病學之意義。本研究利用分子生物學之核酸序列比對方式, 將部分過往及目前所發現之APMV分離株進行鑑定, 作為評估台灣各個不同禽鳥族群間, 副黏液病毒之血清型別流行現況。

APMV-1係家禽產業為最重要之病原之一, 能夠造成幾乎所有種別禽鳥之感染。本研究中發現APMV-1存在於各種不同禽鳥族群中, 由APMV-1融合蛋白基因親緣樹分析中發現雞場主動監測分離株AHRI-72與野鳥APMV-1分離株有共同之起源, 顯示雞場野鳥入侵病毒傳遞的流行病學關係; 本研究野鳥來自候鳥棲地, 不是畜牧場, 因此不見有第VII基因型之NDV。本研究中自野鴨分離到7株APMV-6, 其中6株的融合蛋白核酸序列與張等(2001)於水禽飼養場健康鴨隻分離到病毒APMV-6/duck/Taiwan/Y1/98的序列呈高度相似性(Identity>99%), 顯示相近之APMV-6存在於水禽飼養場及候鳥兩種族群間。

鴿源的第一血清型副黏液病毒(pigeon paramyxovirus serotype 1; PPMV-1)與NDV同屬第一血清型, 在血清學檢測上需要依靠單株抗體(monoclonal antibody), 才能夠將兩者區分[10]。本研究利用融合蛋白之胺基酸序列分析, 可區分出PPMV-1屬於第VI基因型, 並在美國輸入鴿子、台灣家禽飼養場鴿子及寵物鳥紅鳩中檢測出4株PPMV-1, 其中1株AHRI-34之融合蛋白切割位序列為¹¹²RRKKR↓F¹¹⁷, 其餘3株AHRI-1、-43及-68為¹¹²RRQKR↓F¹¹⁷, 均具有多個鹼性胺基酸及117位為phenylalanine, 符合OIE認定之強毒NDV序列特徵。雖然其毒力高低與此核酸序列並不一定有明顯相關性, 然而文獻指出PPMV-1病毒在雞隻或雞胚胎蛋繼代後會造成其毒力增加[9]。在第三次的ND世界大流行即

證實為鴿子來源之變異株[8]。本研究中不論是輸入的禽鳥或是台灣田間及野外，均可以分離到PPMV-1，因此對於該病毒流行病學的持續監測及核酸序列演化研究甚為重要。

野鳥的APMV帶毒監測結果顯示，除APMV-1（23%）外，還包括APMV-4（55%）及APMV-6（23%）。此結果與其他國家之研究相似，如Stanislawek等（2002）在紐西蘭野鳥調查中分離27株APMV，其中37%為APMV-1、63%為APMV-4[17]；美國Stallknecht等（1991）在路易斯安那州共分離27株APMV，分別為APMV-1（67%）、4（15%）、6（15%）及8（4%）[16]；Goekjian等（2011）在北卡羅來納州共分離34株APMV，分別為APMV-1（53%）、4（44%）及6（3%）[6]。

在新加坡輸入鸚鵡所檢出的APMV為目前所有不同檢體來源54株APMV中唯一的一株APMV-2，此血清型APMV已在世界許多國家的家禽及野鳥有分離之研究報告[19]，在台灣雖然家禽場尚無此血清型副黏液病毒分離的病例報告，然而已有文獻指出在中國大部份種類之家禽飼養場，第二型副黏液病毒之血清盛行率均在40%以上，證明此亞型病毒已廣泛分布於中國[20]。由於此型別APMV對於家禽會造成臨床症狀

及影響家禽產業，後續對於台灣養禽場APMV-2的血清學調查及流行病學研究有其必要性。

在傳統上，APMVs依據血清學HI檢測區分為九種血清型，而隨著越來越多新病毒株之發現，以血清學為基準的區分已越來越模擬兩可與失去可信度，Miller等（2010）即在福克蘭群島的企鵝分離到無法歸類之第十血清型，並指出至少還有八株由不同品種企鵝分離到的APMV無法歸類於已建立之十種血清型，至少可再獨立成三種新的血清型別[12]。另一方面，此項漸漸不能符合實際需求的血清學分類技術需要完整之標準抗原及標準抗血清，除國際級參考實驗室外，一般的研究機構並無能力可以進行，因此需要尋求一個替代的工具。在本研究中利用核酸序列比對GenBank資料庫的方式，針對台灣飼養家禽、本地留鳥及季節遷徙候鳥、輸入及走私禽鳥、觀賞鳥等檢體進行病毒血清型別之鑑定。台灣目前僅對於雞新城病有較確切的掌握，但是對於PPMV-1以及APMV血清第二到第九型等其他禽類副黏液病毒的調查，尚付之闕如。初步研究結果顯示國內家禽飼養場、本地留鳥及季節遷徙候鳥、輸入及走私禽鳥、觀賞鳥等不同生態圈中，至少有APMV-1、2、4、6、7等五種血清型之禽類副黏液病毒存在，其發生與分佈及可能之危害亟待進一步探討。

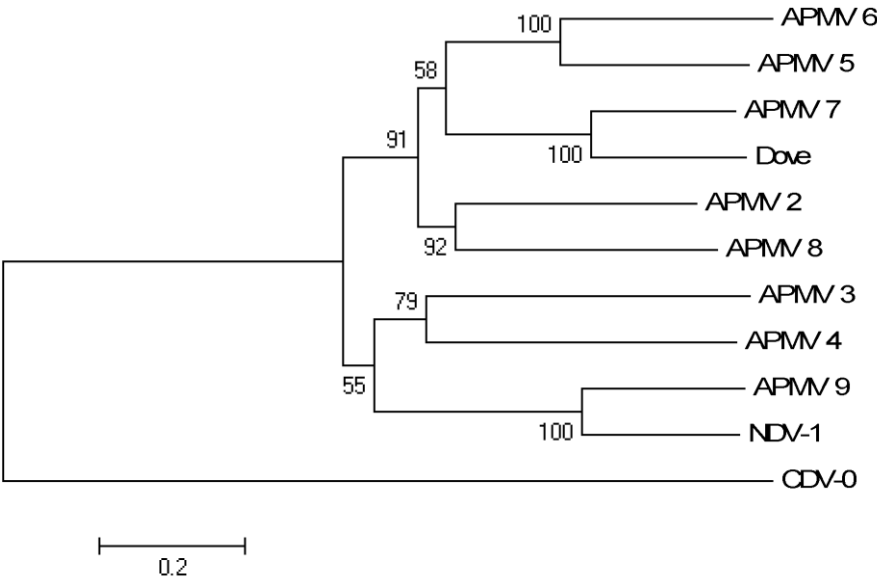


圖 1、紅鳩（Dove）分離株（AHRI-33）血球凝集素神經胺酸酶基因全長親緣樹分析。

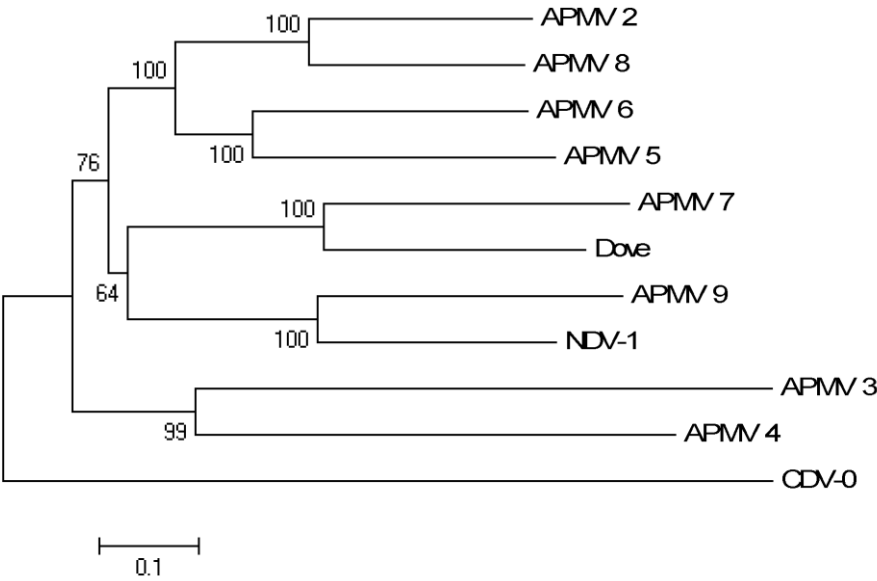


圖2、紅鳩（Dove）分離株（AHRI-33）融合蛋白基因全長親緣樹分析。

臺灣禽類副黏液病毒核酸序列檢測與分析

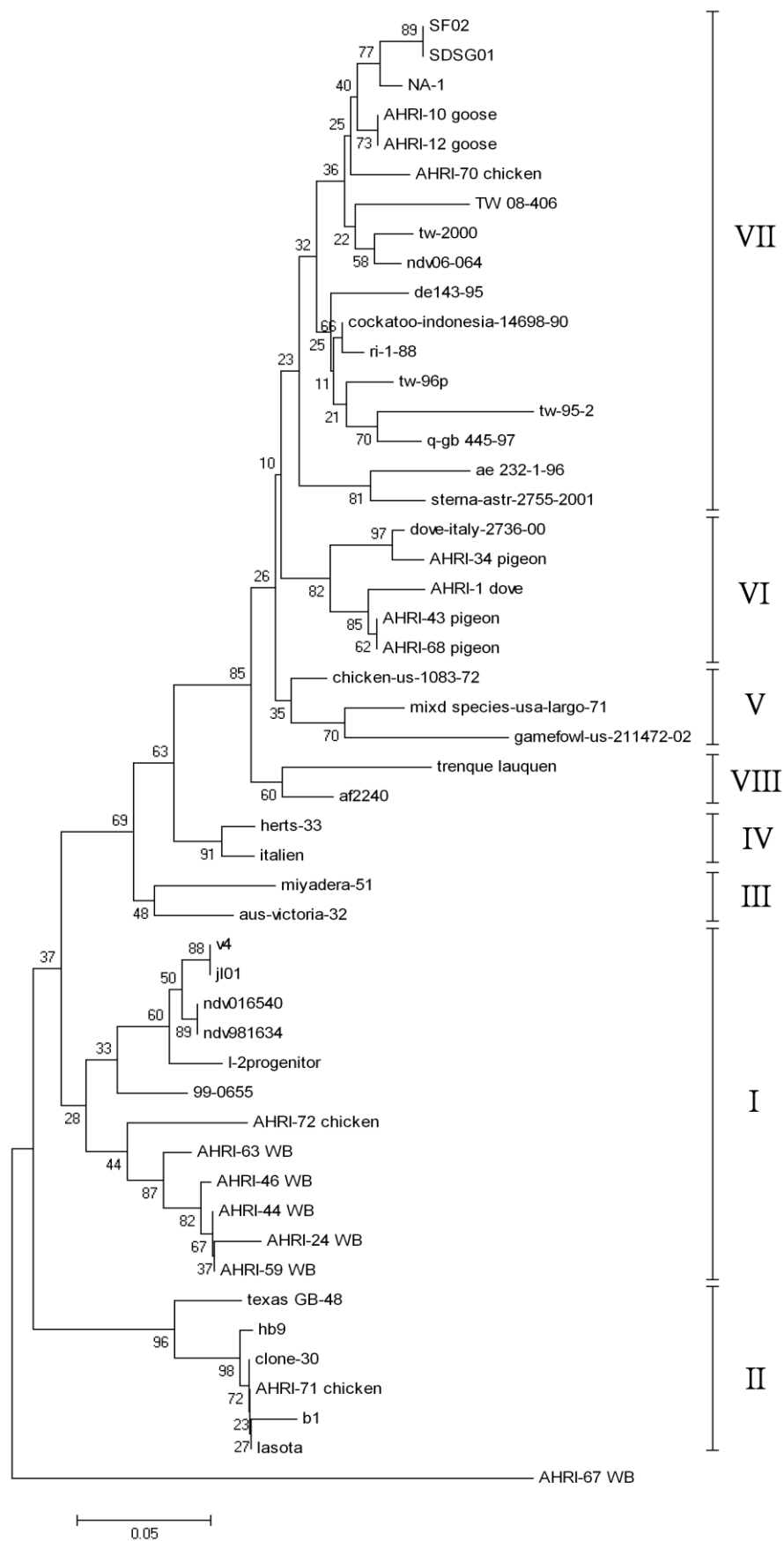


圖 3、APMV-1 分離株之融合蛋白基因親緣樹分析。

表 1、家禽、野鳥、輸入禽鳥及寵物鳥之禽類副黏液病毒分離株之基本資料。

編號	檢體來源	鳥種	分離年份	血清型別	切割位序列 (APMV-1)
AHRI-1	寵物鳥	紅鳩	2008	APMV-1	RRQKR ↓ F
AHRI-3	寵物鳥	紅鳩	2008	APMV-7	
AHRI-9	家禽場	鴨	1998	APMV-6	
AHRI-10	家禽場	鵝	2000	APMV-1	RRQKR ↓ F
AHRI-12	家禽場	鵝	2000	APMV-1	RRQKR ↓ F
AHRI-15	野鳥	鴨	1998	APMV-4	
AHRI-16	野鳥	鴨	1999	APMV-6	
AHRI-17	野鳥	鴨	1999	APMV-4	
AHRI-18	野鳥	鴨	1999	APMV-4	
AHRI-20	野鳥	鴨	2001	APMV-4	
AHRI-21	野鳥	鴨	2001	APMV-4	
AHRI-23	野鳥	鴨	2001	APMV-4	
AHRI-24	野鳥	鴨	2001	APMV-1	GKQGR ↓ L
AHRI-27	野鳥	鴨	2001	APMV-6	
AHRI-28	野鳥	鴨	2001	APMV-6	
AHRI-29	野鳥	鴨	2001	APMV-6	
AHRI-31	野鳥	鴨	2001	APMV-4	
AHRI-32	寵物鳥	紅鳩	2009	APMV-7	
AHRI-33	寵物鳥	紅鳩	2009	APMV-7	
AHRI-34	輸入	鴿子	2009	APMV-1	RRKKR ↓ F
AHRI-35	輸入	鸚鵡	2009	APMV-2	
AHRI-36	野鳥	鴨	2009	APMV-4	
AHRI-37	野鳥	鴨	2009	APMV-4	
AHRI-38	野鳥	鴨	2009	APMV-4	
AHRI-40	野鳥	鴨	2009	APMV-4	
AHRI-41	野鳥	鴨	2009	APMV-4	
AHRI-43	家禽場	鴿子	2010	APMV-1	RRQKR ↓ F
AHRI-44	野鳥	鸚鵡	2010	APMV-1	GKQGR ↓ L
AHRI-45	野鳥	鴨	2010	APMV-6	
AHRI-46	野鳥	鴨	2010	APMV-1	GKQGR ↓ L
AHRI-47	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-48	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-49	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-50	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-51	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-52	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-53	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-54	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-55	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-56	野鳥	鴨	2010	APMV-6	
AHRI-57	野鳥	鴨	2010	APMV-4	

臺灣禽類副黏液病毒核酸序列檢測與分析

AHRI-58	寵物鳥	紅鳩	2010	APMV-7	
AHRI-59	野鳥	鴨	2010	APMV-1	GKQGR ↓ L
AHRI-60	野鳥	鴨	2011	APMV-4	
AHRI-61	野鳥	鴨	2011	APMV-4	
AHRI-62	野鳥	鴨	2011	APMV-4	
AHRI-63	野鳥	鴨	2011	APMV-1	GKQGR ↓ L
AHRI-65	野鳥	鴨	2011	APMV-6	
AHRI-66	野鳥	鴨	2011	APMV-4	
AHRI-67	野鳥	鴨	2011	APMV-1	ERQGR ↓ L
AHRI-68	家禽場	鴿子	2012	APMV-1	RRQKR ↓ F
AHRI-70	家禽場	雞	2012	APMV-1	RRKKR ↓ F
AHRI-71	家禽場	雞	2012	APMV-1	GRQGR ↓ L
AHRI-72	家禽場	雞	2012	APMV-1	GKQGR ↓ L

表 2、家禽、野鳥、輸入禽鳥及寵物鳥之禽類副黏液病毒血清型鑑定結果。

	APMV-1	APMV-2	APMV-4	APMV-6	APMV-7	共計
家禽飼養場	7	0	0	1	0	8
野鳥	6	0	17	7	0	30
輸入禽鳥	1	1	0	0	0	2
寵物鳥	1	0	0	0	13	14
共計	15	1	17	8	13	54

表 3、紅鳩病毒分離株 AHRI-33 各段基因全長與九種禽類副黏液病毒標準株 APMV-1 ~ 9 的胺基酸序列相似度百分比 (percent amino acid sequence identities)。

	N	P	M	F	HN	L
APMV-1 LaSota/46	42	23	33	37	36	26
APMV-2/chicken/California/Yucaipa/56	54	26	40	41	42	44
APMV-3/PKT/Netherland/449/75	34	22	32	27	35	36
APMV-4/duck/Hongkong/D3/75	34	24	29	31	34	34
APMV-5/budgerigar/Kunitachi/74	51	24	46	37	40	44
APMV-6/duck/Hongkong/18/199/77	52	24	45	41	41	44
APMV-7/dove/Tennessee/4/75	73	36	65	55	65	61
APMV-8/goose/Delaware/1053/76	54	25	40	41	39	45
APMV-9/duck/New York/22/1978	41	23	32	37	34	39

※ APMV 各血清型標準株之 NCBI 資料庫之 accession numbers : APMV-1, AF077761 ; APMV-2, EU338414 ; APMV-3, EU403085 ; APMV-4, FJ177514 ; APMV-5, GU206351 ; APMV-6, EF569970 ; APMV-7, FJ231524 ; APMV-8, FJ215863 ; APMV-9, EU910942。

誌謝

本研究之進行承蒙所內計畫經費之補助 (99農科-9.2.2-衛-H2(4))，國立中興大學張伯俊教授慷慨分讓病毒株，使研究得以進行，謹致謝忱。

參考文獻

- 鄭明珠、林地發、黎南榮、劉培柏。1995-1996 年台灣地區野鳥及玩賞鳥類新城雞病毒分離調查。台灣省畜衛所研報。1997。33：137-142。
- 蕭文隆。應用 RT-PCR 及核酸定序技術診斷禽類副黏液病毒。國立中興大學獸醫所碩士論文。1998。
- Alexander DJ, Jones RC. Paramyxoviridae. Poultry diseases. 5th edit. WB Saunders. 2001. 257-280.
- Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. Diseases of poultry. 11th edit. Iowa State Press A Blackwell Publishing Company. 2003. 63-99.
- Chang PC, Hsieh ML, Shien JH, Graham DA, Lee MS, Shieh HK. Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. J Gen Virol. 2001. 82(Pt 9):2157-68.
- Goekjian VH, Smith JT, Howell DL, Senne DA, Swayne DE, Stallknecht DE. Avian influenza viruses and avian paramyxoviruses in wintering and breeding waterfowl populations in North Carolina, USA. J Wildl Dis. 2011. 47(1):240-5.
- Goodman BB, Hanson RP. Isolation of avian paramyxovirus-2 from domestic and wild birds in Costa Rica. Avian Dis. 1988. 32(4):713-7.

8. King DJ. Avian paramyxovirus type 1 from pigeons: isolate characterization and pathogenicity after chicken or embryo passage of selected isolates. *Avian Dis.* 1996. 40(3):707-14.
9. Kommers GD, King DJ, Seal BS, Brown CC. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Dis.* 2001. 45(4):906-21.
10. Kommers GD, King DJ, Seal BS, Carmichael KP, Brown CC. Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. *Vet Pathol.* 2002. 39(3):353-62.
11. Maldonado A, Arenas A, Tarradas MC, Carranza J, Luque I, Miranda A, Perea A. Prevalence of antibodies to avian paramyxoviruses 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain. *Avian Pathol.* 1994. 23(1):145-52.
12. Miller PJ, Afonso CL, Spackman E, Scott MA, Pedersen JC, Senne DA, Brown JD, Fuller AM, Uhart MM, Karesh WB, Brown IH, Alexander DJ, Swayne DE. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J Virol.* 2010. 84(21):11496-504.
13. Saif YM, Mohan R, Ward L, Senne DA, Panigrahy B, Dearth RN. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7. *Avian Dis.* 1997. 41(2):326-9.
14. Samuel AS, Kumar S, Madhuri S, Collins PL, Samal SK. Complete sequence of the genome of avian paramyxovirus type 9 and comparison with other paramyxoviruses. *Virus Res.* 2009. 142:10-8.
15. Shihmanter E, Weisman Y, Panshin A, Manvell R, Alexander D, Lipkind M. Isolation of avian paramyxovirus serotype 3 from domestic fowl in Israel: close antigenic relationship with the psittacine strain of avian paramyxovirus serotype 3. *J Vet Diagn Invest.* 2000. 12(1):67-9.
16. Stallknecht DE, Senne DA, Zwank PJ, Shane SM, Kearney MT. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana. *J Wildl Dis.* 1991. 27(1):123-8.
17. Stanislawek WL, Wilks CR, Meers J, Horner GW, Alexander DJ, Manvell RJ, Kattenbelt JA, Gould AR. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Arch Virol.* 2002. 147:1287-302.
18. Warke A, Appleby L, Mundt E. Prevalence of antibodies to different avian paramyxoviruses in commercial poultry in the United States. *Avian Dis.* 2008. 52(4):694-7.
19. Wood AM, Dagless MD, Pirie JO, Garcia-Rueda MC, Manvell RJ, Cox WJ, Ceeraz V, Pearson DB, Law WA, Alexander DJ, Brown IH. Isolations of avian paramyxovirus type 2 from domestic fowl in Scotland in 2002 and 2006. *Vet Rec.* 2008. 162(24):788-9.
20. Zhang GZ, Zhao J, Wang M. Serological survey on prevalence of antibodies to avian paramyxovirus serotype 2 in China. *Avian Dis.* 2007. 51:137-9.

Sequence Analysis of Avian Paramyxoviruses in Taiwan

YP Liu^{1,2}, MC Cheng¹, MS Lee¹, LH Chen¹, SH Lee¹, HJ Tsai^{1,2,*}

¹ National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

² School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

SUMMARY Avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease, ND) is most commonly isolated serotype in Taiwan; however the information about the distribution of all APMV serotype 1-9 in domestic poultry, wild birds, imported birds and pet birds is very limited. This study used molecular techniques to determine serotypes and the distribution of these in Taiwan. Fifty-four APMV isolates were characterized to be 15 APMV-1, 1 APMV-2, 17 APMV-4, 8 APMV-6 and 13 APMV-7, respectively. The complete genome sequence of APMV-7 strain AHRI-33 was determined, and this strain showed only 36~73% of amino acid identity with the reference APMV-7 strains in GenBank. Our results provide evidence for the existence of subgroups within a given serotype. The results of the phylogenetic analysis of fusion proteins placed 15 APMV-1 strains into five genotypes- I, II, VI, VII and one additional novel genotype. The present study suggests that in addition to ND, there are at least four more serotypes of APMVs circulating in poultry and wild birds in Taiwan. This information may prove be useful for future epidemiological studies of APMV isolates from Taiwan.

Keywords: *Avian paramyxovirus, Newcastle disease*