

2004 年台灣家禽流行性感冒監測

鄭明珠* 李敏旭 郭舒亭 李淑慧 蕭終融 宋華聰
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

為持續性監測家禽流行性感冒(avian influenza; AI)在台灣野鳥及家禽的帶毒情形及疫情。野鳥樣本主要為候鳥季期間採集自台北、宜蘭、台南、彰化、嘉義及金門的水鳥棲地排遺檢體。2004年1至12月共完成野鳥監測計3,351個樣本，監測得17株禽流感病毒，亞型別有H10N3、H6N5、H4N6、H4N2、H4N8、H5N2、H5N6、H11N9、H10N6九種，其中有5株病毒為H4N6，5株病毒為H11N9。監測到的家禽流行性感冒病毒仍然主要來自鴨科鳥類，因此集中於鴨科鳥類遷徙來台的前幾個月(10月至12月)。九月於彰化的繫放鳥類中杓鵯分離出一株H6N5病毒，證實台灣遷徙鳥類中之鵯鵯科也帶毒，12月在台北關渡監測到H5N2及H5N6病毒，係首次在台灣野鳥監測到H5亞型病毒株，然經病原性鑑定為弱毒株。家禽場監測樣本來自發現H5或H7病毒陽性周圍三公里場監測及H5或H7抗體陽性場之病毒監測。同時H5或H7病毒陽性場清場後之哨兵家禽監測也列入本監測內。今年1至12月總計監測4,814個病毒監測用樣本，只有在1至2月監測到三場有H5N2病毒，以IVPI鑑定其毒力均為弱毒，其中一場為養鴨場，養鴨場的病毒株經基因序列分析，與雞場分離之病毒株差異大，顯示這株鴨源H5N2並非是雞場H5N2的來源株。

關鍵詞：家禽流行性感冒，病毒監測

緒言

家禽流行性感冒(avian influenza, AI)為正黏液病毒(Orthomyxoviridae)感染引起的一種禽類重要傳染病[20]，感染的禽類宿主種類非常廣泛。AI病毒具有多種不同亞型，已知有亞型H1-H15，N1-N9，由血球凝集素(Haemagglutinin; H)及神經氨酸(Neuraminidase; N)兩種不同抗原搭配之多種亞型組合[2]。相同亞型病毒株的毒力不同，對於不同種禽類宿主的感受性也不同。通常只有H5和H7亞型病毒會引起雞隻及火雞惡性傳染及急速而高度的死亡率[10]，稱之為高病原性家禽流行性感冒(Highly pathogenic avian influenza; HPAI)，HPAI為世界動物衛生組織(OIE)A表之國際通報性動物傳染病[11]。

家禽流行性感冒與野鳥的帶毒關係調查研究起始於1970年代[13]，陸續有許多學者開始關注及展開對野鳥的流行性感冒調查研究，最後獲得的共識是：不同品種的鳥類對流行性感冒病毒有不同的感受性；不同亞型株病毒對不同種野鳥也有不同的致病性。水鳥感染流行性感冒不會發病，所以是流行性感冒重要的帶原者[6,8,12,13,17]。一般來說，野鴨是最普遍的帶毒者[6,13,16]，鵯科鳥類和海鷗所帶的病毒其基因與野鴨的分屬不同群，所以推論在野鳥的AI病毒保毒者主要分成三群，即野鴨、鵯科鳥類及海鷗[18]。AI病毒在水鳥體內增殖部位通常只在腸管，不容易刺激水鳥體內產生抗體，所以病毒在微弱的抗體篩選壓力下不易發生

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

點突變而保有穩定的基因群[4,8]。遷徙性野生水禽繁殖地通常在寒冷的冰雪地帶，是病毒保毒的場所，也是感染新鳥的重要來源，因此家禽流行性感胃的發生季節常與候鳥遷徙季有關[6,14,16]。

1997年底香港爆發H5N1之高病原性家禽流行性感胃，病毒因感染人且造成18位感染者中6位死亡，陸續至2002年之間，香港H5N1病毒一直反覆出現於家禽場或批發市場內。亞洲地區禽流感情在2003年底逐漸擴大，2004年中國大陸、日本、韓國及東南亞多國等多個國家皆淪陷為H5N1 HPAI的疫區。台灣雖仍處於H5N1感染之清淨區，但是在2004年初卻在養雞場發現了H5N2弱毒型家禽流行性感胃，政府為防堵病毒常在化而變異為強毒的可能性，毅然採行感染場撲殺的措施。因此本計畫進行持續監測禽流感在台灣的情況，包括各種野鳥及家禽，並由監測結果進行分析推測及適時預警。

材料與方法

監測樣本

野鳥樣本由台北市野鳥學會採樣送檢，樣本主要為候鳥季期間採集自台北、宜蘭、台南、彰化、嘉義及金門的水鳥棲地排遺檢體。家禽場監測樣本來自發現H5或H7病毒陽性周圍三公里監測場及H5或H7抗體陽性場之病毒監測。同時H5或H7病毒陽性場清場後之哨兵家禽監測也列入本監測樣本內。

AI病毒分離

AI病毒係以雞胚胎培養法進行分離[9]。野鳥排遺樣本試管內棉棒取掉後，先經1,500 rpm低速離心去除沉渣，上清液以0.45μm過濾膜過濾後，接種於無特異病原（SPF）雞胚（購自本所動物藥品檢定分所）之尿囊腔，每個蛋接種0.2mL，每個樣本接種2個蛋。在35℃培養48小時後，先檢測其尿囊液是否具血球凝集性（HA）。HA陽性者之部份尿囊液以電子顯微鏡負染色法觀察是否有正黏液病毒顆粒，其餘尿囊液保存及預備進行亞型鑑定用。無血球凝集性之尿囊液再盲目繼代，最多接種2代以分離病毒。

AI病毒鑑定及亞型分析

HA及NA亞型分析方法係參考世界衛生組織編撰之流行性感胃實驗室操作手冊所述[9]。HA亞型鑑定方法以血球凝集抑制試驗（hemagglutination inhibition test, HI）進行之，而NA亞型鑑定方法則以神經胺酸抑制試驗（neuraminidase inhibition test, NI）進行之。H及N亞型標準血清分讓自日本北海道大學Dr. H. Kida及美國田納西州St. Jude 兒童研究醫院Dr. R. G. Webster。

AI毒力鑑定

所有分離的AI病毒株進行毒力鑑定，毒力鑑定之方法係依照世界動物衛生組織規定之方法進行[5]。試驗方法分述如下：

雞隻靜脈接種法：將需鑑定毒力之毒株增殖後之新鮮尿囊液稀釋10倍，以靜脈接種法接種於6週齡健康雞隻，每隻雞接種0.1mL，每株病毒接種8隻雞。記錄接種後10日內雞隻發病及死亡隻數。

HA蛋白水解切割位氨基酸分析：HA段引子序列參考Wood等[21]報告所設，以自動定序儀讀取核苷酸序列。利用核苷酸序列轉譯方法讀取HA蛋白水解切割位之氨基酸序列，並由DNASTAR分析軟體比較GenBank中其他強毒株之HA序列。

結果

野鳥監測

完成野鳥監測計3,351個樣本(表1)，監測得17株禽流感病毒(表2)，H10N3、H6N5、H4N6、H4N2、H4N8、H5N2、H5N6、H11N9、H10N6九種亞型，其中有5株病毒為H4N6，5株病毒為H11N9。監測之樣本主要為野鴨、鸕鶿科鳥類、鷗的排遺及少數拾獲生病或死亡個體及家禽場內或附近收集之陸鳥，1月至2月以鴨科鳥類為主，3月至7月以鸕鶿科鳥類為主，八月以鸕鶿科及鷗科鳥類為主，9月開始除了鸕鶿科之外，鴨科鳥類的數量又逐月增加了。監測到的家禽流行性感胃病毒仍然主要由鴨科鳥類分離得，因此集中於鴨科鳥類遷徙來台的前幾個月(10月至12月)。今年9月於彰化的繫放鳥類中杓鷗分離出一株H6N5病毒，證實台灣遷徙鳥類中之鸕鶿科也帶毒，十二月在台北關渡監測到H5N2及H5N6病毒，係首次在台灣野鳥監測到H5

亞型病毒株，然經病原性鑑定為弱毒株($IVPI=0.0$)，且分析其HA序列也不同於台灣雞場H5N2分離株。

家禽場監測

家禽場監測樣本來自發現H5或H7病毒陽性周圍三公里場監測及H5或H7抗體陽性場之病毒監測。同時H5或H7病毒陽性場清場後之哨兵家禽監測也列入本監測內。今年1至12月總計監測4,814個病毒監測用樣本(表1)，只有在1至2月監測到三場有H5N2病毒(表2)，其中一場為養鴨場，養鴨場的病毒株經基因序列分析，與雞場分離之病毒株差異大，顯示這株鴨源H5N2並非是雞場H5N2的來源株，鑑定其毒力均為弱毒($IVPI=0.0$)。

討論

今年的野鳥AI病毒分離較過去兩年多，依據往年的監測統計，候鳥帶毒的高峰為遷徙初期，往年為9月最高峰而後逐月下降。但是近幾年來，氣溫變高，暖冬的效應使候鳥遷徙的季節往後延並提前結束，由去年的監測數據發現病毒分離的最高峰已延至11月份，而今年冬季氣候濕冷，在11月及12月份的病毒檢出量出明顯多於去年，所以候鳥帶毒的情形與氣候應該是有明顯的關係。

今年9月於彰化的繫放鳥類中杓鵯分離出一株H6N5病毒，證實台灣遷徙鳥類中之鵯科也帶毒。雖然野鴨是已知最多亞型的帶毒者[7,15,19]，但是依據Kawaoka等[21]的研究發現鵯科和鵝科鳥類帶毒的基因群與野鴨不同，所以從前年起我們就逐漸增加鵯科鳥種的監測量，並且在夏季鵝科鳥類在離島繁殖季時期安排進行鵝科鳥類之採樣監測，但仍無法由鵝科鳥類檢出AI病毒，表示鵝科鳥類遷徙來台的夏季期間帶毒的機率顯然非常低，因此由流行病學推論該種鳥類對於台灣的AI候鳥傳播上並不重要。

12月在關渡自然公園的監測樣本測得H5N2及H5N6病毒，分別分離自鵯科鳥類及鴨科鳥類，係首次在台灣野鳥監測到的H5亞型病毒株，這兩株病毒經鑑定結果對雞隻都沒有病原性，而其HA基因序列屬於歐亞基因群，不同於2004年1-3月台灣雞場分離的

H5N2亞型病毒，雞場分離的病毒株的HA基因屬於北美基因群。

今年2月份由彰化縣H5N2撲殺場附近溼地鵯科鳥類及彰化地區收集的陸生野鳥(包括麻雀、紅鳩等)監測病毒結果均呈陰性，惟部分H5N2撲殺場內野鳥監測結果抗體具弱陽性反應，此現象表示H5N2家禽流行性感胃雖可感染麻雀等陸生野鳥，但其感受性並不好，因此野鳥傳播本病的危險性目前僅限於短距離的機械式攜帶傳播。

致謝 本監測計畫(編號93農科-1.7.2-衛-H1(3))承蒙台北市野鳥學會協助候鳥樣本採集、各縣市家畜疾病防疫單位採集家禽場樣本等，特此申謝。

參考文獻

1. 張萬福。1973。台灣的水鳥。東海大學環境科學研究中心出版。
2. Alexander, D.J. 2000. A review of influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74,3-13.
3. Alexander, D.J. 1982. Ecological aspects of influenza viruses in animal and their relationship to influenza: A review. *J. R. Soc. Med* 75, 799-811.
4. Alexander, D.J. 1982. Isolation of influenza A viruses from birds in Great Britain during 1980 and 1981. *Vet. Rec.* 111, 319-21.
5. Alexander, D.J. 1996. Highly pathogenic avian influenza. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 3th ed. OIE, Paris, France.
6. Alfonso, C.P., Cowen, B.S., van Campen, H. 1995. Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania. *J. Wildl. Dis.* 31, 179-85.
7. Allan, W.H. 1981. Diagnostic procedures-response. *Proc. 1st. Int. Symp. Avian Influenza*, Beltsville, Maryland, USA, 167-171.
8. Austin, F.J., Hinshaw, V.S. 1984. The isolation of influenza A viruses and paramyxoviruses from feral

- ducks in New Zealand. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 62, 355-60.
9. Aymard-Henry, M., Coleman, M.T., Dowdle, W.R., Laver, W.G., Schild, G.C. and Webster, R.G. 1973. *Bull. WHO.* 48, 199-202.
 10. Bosh, F.X., Orlich, M., Klenk, H-D. and Rott, R. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95, 197-207.
 11. Esterday, B.C. 1991. Influenza. In *Diseases of Poultry* (9th ed.), Ames, Iowa State University Press 532-551.
 12. Hinshaw, V.S. 1987. The nature of avian influenza in migratory waterfowl, including interspecies transmission. *Proc. 2nd. Int. Symp. Avian Influenza*, Athens, GA, USA, 133-141.
 13. Hinshaw, V.S., Webster, R.D. and Turner, B. 1980. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* 26, 622-629.
 14. Hinshaw, V.S., Wood, J.M., Webster, R.G., Deibel, R. and Turner, B. 1985. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull. WHO.* 63, 711-791.
 15. Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. 1984. Avian influenza, 8th ed. *Dis. Poult.* 482-495.
 16. Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A., Webster, R.G., Kida, H. 1995. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.* 140, 1163-72.
 17. Karunakaran, D., Hinshaw, V., Poss, P., Newman, J., Halvorson, D. 1983. Influenza A outbreaks in Minnesota turkeys due to subtype H10N7 and possible transmission by waterfowl. *Avian. Dis.* 27, 357-66.
 18. Kawaoka, Y., Chambers, T.M., Sladen, W.L., Webster, R.G. 1988. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 163, 247-250.
 19. Otsuki, K., Takemoto, O., Fujimoto, R., Yamazaki, K., Kubota, N., Hosaki, H., Kawaoka, Y., Tsubokura, M. 1987. Isolation of influenza A viruses from migratory waterfowl in San-in District, Western Japan in the winter of 1982-1983. *Acta. Virol.* 31, 439-42.
 20. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152-178.
 21. Wood, G.W., McCauley, J.W., Bashiruddin, J.B. and Alexander, D.J. 1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.* 130, 209-217.

表 1、93 年家禽流行性感冒監測統計

檢測項目	\月份	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
病毒 檢測	野鳥監測 ^a													
	陽性數/樣本數	1/518	0/270	0/128	0/163	0/32	0/26	0/45	0/214	1/267	2/339	4/709	9/639	17/3,351
	家禽場監測 ^b													
	陽性場數/檢測場數 (檢測數)	2/23 (480)	1/21 (350)	0/29 (580)	0/21 (434)	0/26 (651)	0/32 (860)	0/19 (490)	0/14 (309)	0/11 (340)	0/4 (80)	0/5 (140)	0/5 (100)	3/210 (4,814)
檢測數	總計	998	620	708	597	683	886	535	422	606	419	849	708	20/8,031

樣本來源說明：

A. 野鳥樣本來自野鳥學會採集鴨、鵝、鸕科鳥類、鷗的排遺及拾獲生病或死亡個體及少數家禽場內陸鳥。

B. 家禽場樣本來自 H5N2 撲殺場周圍三公里持續 6 個月監測場、H5N2 撲殺場哨兵家禽及主動監測之抗體陽性場。

表 2、九十三年家禽流行性感冒監測病毒分離統計

月份	野鳥	家禽	月分離株數
一	鴨/台北/WB409/04(H10N3)	鴨/雲林 /A128/04(H5N2)LPAI 雞/嘉義 /A132/04(H5N2)LPAI	3
二		雞/彰化 /A135/04(H5N2)LPAI	1
九	中杓鵝/彰化/WB459-1/04(H6N5)		1
十	鴨/彰化/WB471-19/04(H4N6) 鴨/彰化/WB471-16/04(H4N6+H4N2)		2
十一	鴨/台北/WB499-1/04(H4N6) 鴨/台北/WB499-12/04(H4N6) 鴨/台北/WB499-22/04(H4N8) 鴨/嘉義/WB512/04(H4N2)		4
十二	鵝/台北/WB12-519-6-10/04(H5N2)LPAI 鴨/台北/WB12-522-11-15/04 (H5N6)LPAI 鴨/金門/WB12-528/04 (H11N9) 鴨/金門/WB12-538-1-5/04 (H11N9) 鴨/金門/WB12-538-6-10/04 (H11N9) 鴨/金門/WB12-538-11-15/04(H11N9) 鴨/台北/WB12-539-66-70/04 (H10N6) 鴨/台北/WB12-539-76-80/04 (H4N6) 鴨/台北/WB12-539-106-110/04 (H1N9)		9
總分離數	17	3	20

Surveillance of Avian Influenza in Taiwan in 2004

M. C. Cheng^{*}, M. S. Lee, S. T. Kuo, S. H. Lee, J. R. Shiau, Wastson H. T. Song

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Tansui, Taiwan, ROC

ABSTRACT The purpose of this surveillance is to realize epidemiology of avian influenza in Taiwanese wild birds and poultry farms. In 2004, a total of 3,351 of fecal samples from wild birds were examined. Seventeen viruses were isolated and subtyped as H10N3, H6N5, H4N6, H4N2, H4N8, H5N2, H5N6, H11N9 and H10N6. Most of these viruses were isolated from duck fecal samples; however two viruses, H6N5 and H5N2, were isolated from shorebird. In addition, 3 strains of H5N2 viruses were isolated from 4,814 samples collected from poultry farms, including 2 from chicken farms and one from domestic duck farm. All isolated AIVs were demonstrated to be low pathogenic viruses. From nucleotides sequence analysis of gene segments of haemagglutinin (H) and neuroaminidase (N) revealed that H5N2 viral strain isolated from domestic duck and chicken were different originate.

Key words: Avian influenza, Virologic surveillance

^{*}Corresponding Author
Animal Health Research Institute