

2002 年野鳥家禽流行性感冒病毒學監測及流行病學研究

鄭明珠* 李敏旭 郭舒亭 陳燕萍 蕭終融

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 台灣位於歐亞大陸東亞區候鳥遷徙路線上，每年有成千上萬的水鳥群來台渡冬，本研究自 1998 年開始每年有系統性地進行，其目的希望藉由野鳥帶毒的監測，提供農政單位疫情的預警資訊，並經由連續數年的監測資料累積分析，了解其流行病學角色及意義。本年度（2002 年）共進行 106 件樣次 2,722 個野鳥排遺樣本數之監測。全年分不同月份季節採集不同重點鳥類，1~2 月及 10~12 月為鴨科，3~5 月及 12 月為鵲鴒科，7~8 月為鷗科鳥類。監測鳥群仍以鴨科 (*Anatidae*) 為大宗，佔 72.7% (n=1980)；鵲鴒科 21.7% (*Scolopacidae and Charadriidae*) 為次 (n=592)；其他較少數者為鷗科、琵鷺及鸕鷀。各地監測數：金門 750 個、宜蘭 530 個、台南 912 個、台北 417 個、嘉義 41 個及馬祖 72 個。本年共檢出 13 株家禽流行性感冒病毒株，主要分離自台北及宜蘭，病毒分離的高峰期為 11 月份。分離的病毒的亞型有 1 株 H10N2、1 株 H6N1、1 株 H6N2、4 株 H4N6、2 株 H3N2、1 株 H3N6、1 株 H3N7 及 2 株無法完全鑑定亞型的病毒株。另分離到 5 株新城病病毒。結果發現本年度分離的病毒株仍然以冬季鴨科鳥類出現為主，所有的病毒皆為弱毒株，也沒有任何 H5 或 H7 亞型病毒發現。

關鍵字：家禽流行性感冒，正黏液病毒，病毒監測，病毒亞型，野鳥

緒

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

言

家禽流行性感冒 (avian influenza, AI) 是一種禽類重要傳染病，對雞及火雞可能引起惡性傳染及急速死亡[11]，在 1878 年首先由 Perroncito 提出病例報告[3]，早期曾將本病稱之為雞瘟 (fowl plague) [15]，直到 1981 年雞瘟這個病名才被改為高病原性家禽流行性感冒 (highly pathogenic avian influenza, HPAI)

[7]，因為發現不是所有 AI 病毒皆為高病原性，不同的 AI 病毒有不同程度的致病性。

家禽流行性感冒病毒屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 的 A 型流行性感冒病毒[20]，具 8 條個別片段的 RNA，製造 10 種不同蛋白質；其中以表面蛋白血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經氨酸 (neuraminidase, NA) 可將病毒區分為不同的亞

型 (subtypes)。目前已知有 15 種 HA 亞型 (H1-H15) 及 9 種 NA 亞型 (N1-N9) [2]。大部份的 H 和 N 亞型之 AI 病毒都曾發現於鳥類，尤其是野生水鳥[20]。根據歷年來世界上爆發的 HPAI 病例發現其病毒經鑑定皆為 H5 或 H7 亞型[10]。

家禽流行性感胃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胃調查研究，最後獲得的共識是：不同品種的鳥類對流行性感胃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。水鳥感染流行性感胃不會發病，所以是流行性感胃重要的帶原者 [6,8,12,13,17]。一般來說，野鴨是最普遍的帶毒者 [6,13,16]，鸕鶿科鳥類和海鷗所帶的病毒基因庫與野鴨分屬不同群，所以推論在野鳥的 AI 病毒保毒者主要分成三群，即野鴨、鸕鶿科鳥類及海鷗[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]。

台灣位於歐亞大陸東亞區候鳥遷徙路線上，每年有成千上萬的水鳥群來台渡冬[2]，這些野鳥在台灣與國際間穿梭，牠們在 AI 所扮演的真正流行病學角色如何？本研究自 1998 年開始每年有系統性地進行，其目的希望藉由野鳥帶毒的監測，提供農政單位疫情的預警資訊，並經由連續數年的監測資料累積分析，了解其流行病學角色及意義。

材料與方法

野鳥排遺採樣

由台北市野鳥學會根據往年台灣各區溼地野鴨及鸕鶿科鳥類出現分佈情形選定適宜採樣之樣點：南、北及金門各 1 至 3 樣點。原則上每群鳥採 20 件排遺樣本，候鳥季每月提供 200 件樣本數。非候鳥季則依樣點之留鳥數而定，每群鳥最多採 10 件樣本數。鳥類排遺樣本以棉棒採集後，放入輸送保存液內，冷藏包裝後寄送至實驗室進行 AI 病毒分離。

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，然後接種 0.2 mL 於無特異病原 (SPF) 雞胚（購自行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物藥品檢定分所）之尿囊腔。在 35 °C 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 日內雞隻死亡隻數。

組織細胞培養胰蛋白 依存試驗：採用 MDCK 細胞進行試驗，分兩組接種病毒，試驗組之培養液不添加胰蛋白，對照組添加 0.02% 胰蛋白，觀察兩組產生 CPE 情形。

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 酸序列。利用核 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

監測樣本分析

自 2002 年 1 月至 12 月共進行 106 件樣次 2,722 個野鳥排遺樣本數之監測。全年分不同月份季節採集不同重點鳥類，來台鴨科鳥類今年二月後即劇減，所

以監測至 2 月，三月開始著手監測尚未離台及過境的鵝鵝科鳥類，進行至五月後，七至八月赴馬祖採集夏候鳥海鷗樣本，秋季十月鴨科鳥類來臨後才開始監測（表 1）。監測鳥群仍以鴨科（*Anatidae*）為大宗，佔 72.7%（ $n=1,980$ ），鵝鵝科 7.7%（*Scolopacidae* and *Charadriidae*）為次（ $n=592$ ），其他較少數者為鷗科、琵鷺及鸕鶿（表 2）。各地監測數：金門 750 個、宜蘭 530 個、台南 912 個、台北 417 個、嘉義 41 個及馬祖 72 個（表 3）。

病毒鑑定及亞型分析

本年監測之病毒株主要發現台北及宜蘭。共檢出 13 株禽流感病毒，經 HI 及 NI 亞型鑑定，分別為 1 株 H10N2、1 株 H6N1、1 株 H6N2、4 株 H4N6、2 株 H3N2、1 株 H3N6、1 株 H3N7 及 2 株無法完全鑑定亞型的病毒株。另有 5 株副黏液病毒。所有病毒發現時間仍以冬季為主（表 4）。

毒力鑑定及基因序列分析

所有檢出之流行性感冒病毒經雞隻靜脈接種法及胰蛋白 依存試驗來檢測病毒的毒力結果，所有的毒株都不會造成任何雞隻發病或死亡，並且無法生長於未添加胰蛋白 的培養液下，所以均為弱毒株（表 4）。

副黏液病毒經 PCR 特異引子分析，證實為新城病病毒，分析 F 切割位核酸序列推演之氨基酸結果，亦皆為弱毒株（表 4）。

討 論

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，如以今年監測的數據發現病毒分離的最高峰已延至 11 月份，鴨科鳥類的監測採樣也由 5 年前的 4 月提前於 2 月結束（表 1）。所以候鳥帶毒的情形與氣候應該是有明顯的關係。

雖然野鴨是已知最多亞型的帶毒者[7,15,19]，但是依據 Kawaoka 等人[21]的研究發現鵝鵝科和鷗科鳥類帶毒的基因群與野鴨不同，所以我們今年監測的鳥種增加了馬祖的鷗科鳥類，鵝鵝科鳥類也提升樣本量達總樣本數的 21.7%（表 2）。但是在這兩類鳥中只有在鵝鵝科鳥類分離 1 株無法鑑定出亞型的病毒。鷗科鳥類在馬祖的時間為夏天，病毒活存不易，所以帶毒

量低，不容易檢出。鵝鵝科鳥類品種繁多，來台灣的族群以濱鵝最多，所以採集量濱鵝為主。如果能排除鵝鵝科鳥類樣本採集的困難的話，我們希望今後當研究各種不同品種鵝鵝科鳥類來台時間、停留季節、品種分類來進行帶毒分析。以釐清來台的鵝鵝科鳥類是否也帶特殊亞型病毒的特性。

根據往年金門地區檢測出病毒的機率非常低。今年度也不例外，該地區只發現 1 株 H10N2 病毒（表 3、表 4），但有趣的是今年我們發現有副黏液病毒在金門舊金城棲地處重複地被檢測到。

在宜蘭縣的監測樣本中，所有的病毒株皆為 H3 亞型（表 3、表 4），我們認為這些病毒是台灣家鴨場的病毒株傳播到野鴨。2002 年 5 月起我們監測宜蘭縣的家鴨場，發現有許多鴨場存在著 H3 亞型病毒，但是過去幾年來，野鳥的監測中卻很少發現 H3 病毒株，今年的監測卻發現宜蘭的野鴨突然間出現了這麼多 H3 的病毒株，足見野鳥會帶病毒傳播入境感染家禽，但也會受本土家禽感染而將病毒傳播出去，所以野鳥在家禽場間扮演的疾病互傳角色不容小覷。

致謝 本計畫（編號 91 農科-7.2.2-衛-H1(1)）承蒙台北市野鳥學會協助樣本採集，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. 2002 年野鳥家禽流行性感冒監測樣本分析

月	樣次	樣數	主要鳥種	AI 病毒分離數 (分離率%)
1	13	362	鴨	1 (0.28)
2	9	199	鴨	0 (0.00)
3	8	74	鵝鵝	0 (0.00)
4	5	100	鵝鵝	0 (0.00)
5	4	80	鵝鵝	0 (0.00)
6	0	0	-	-
7	1	35	鷗	0 (0.00)
8	2	37	鷗	0 (0.00)

9	0	0	-	-
10	12	203	鴨	2 (0.99)
11	24	496	鴨	6 (1.21)
12	28	1136	鴨、鵝、鸕	4 (0.35)
合計	106	2722		13 (0.48)

表 2. 2002 年野鳥 AIV 監測樣本鳥類分析

鳥種	樣次	樣本數 (百分比)	AIV 分離數 (分離率%)
鴨	76	1,980(72.7)	12(0.61)
鵝、鸕	25	592 (21.7)	1(0.17)
鸕、鵝	1	2 (0.1)	0(0.0)
鸕	3	72 (2.6)	0(0.0)
黑琵	1	76(2.7)	0(0.0)
合計	106	2,722(100)	13(0.48)

表 3. 2002 年臺灣野鳥家禽流行性感冒各採樣地區分離病毒數及型別

地區	樣次	樣本數	分離數 (分離率%)	型別
金門	30	750	1 (0.13)	H10N2
台北	13	417	7 (1.68)	H6N1、H6N2、H4N6
宜蘭	28	530	4 (0.75)	H3N2、H3N6、H3N7、H3N?
台南	30	912	1 (0.11)	H?N?
馬祖	3	72	0 (0.00)	-
嘉義	2	41	0 (0.00)	-
合計	106	2722	13 (0.48)	7 亞型

H?N?表示無法鑑定出亞型。

表 4. 2002 年野鳥監測病毒分離株

AIV 亞型	分離株	分離地	鳥種	分離月份
H10N2	1	金門	鴨	1
H6N1	1	台北	鴨	10
H6N2	1	台北	鴨	11
H4N6	1	台北	鴨	11
H3N2	2	宜蘭	鴨	11

H3N6	1	宜蘭	鴨	11
H3N?	1	宜蘭	鴨	11
H3N7	1	宜蘭	鴨	10
H?N?	1	台南	環頸雉	12
H4N6	3	台北	鴨	12
NDV	1	台北	鴨	11
	2	台南	鴨	11
	2	金門	鴨	10
合計	18	株		

※ 所有分離株皆為弱毒株，H?N?表示亞型尚無法鑑定出之 AI 病毒株。

Avian Influenza Surveillance in Wild Birds in Taiwan

Cheng, M. C*, M. S. Lee, S. T. Kuo, Y. P. Chen, J. R. Shiau

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture

SUMMARY Taiwan located in the way of waterfowl migration in North-Asia. There are several thousands of birds visiting Taiwan in winter every year. We have surveyed the highly pathogenic avian influenza viruses in wild birds since 1998. In 2002, a total of 2,722 fecal samples including 72.7 % (1,980) from ducks (*Anatidae*) and 21.7 % (592) from shorebirds (*Scolopacidae* and *Charadriidae*), were collected from wild birds in Taiwan for virus isolations. The surveillance regions contains Kinmen (750 samples), Yilan (530), Tainan (912), Taipei (417), Gahyi (41), and other regions (72). Eighteen viruses were isolated from those samples. Thirteen out of 18 viruses were identified to be influenza viruses, containing 4 subtypes (H10, H4, H6 and H3) of HA antigens. In addition, 5 lentogenic strains of newcastle disease virus were identified. However, all of avian viruses isolated were nonpathogenic.

Keywords: *Avian influenza, Orthomyxovirus, Virologic surveillance, HA and NA subtypes, Wild birds*

* Corresponding Author
Animal Health Research Institute