

野鳥家禽流行性感冒帶毒監測

鄭明珠^{1*}、李敏旭¹、郭舒亭¹、丁履紉¹、蕭終融¹、祁偉廉²、姚中慧³、林士鈺¹

1. 行政院農業委員會家畜衛生試驗所
2. 社團法人台北市野鳥學會
3. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

摘要

自 1999 年 8 月至 2000 年 12 月共採樣 2,572 件野鳥排遺監測樣本數，其中 113 件為非野鴨候鳥季樣本，其餘則為候鳥季樣本。樣本鳥群主要為鴨科(*Anatidae*)，次為鸕鶿科(*Scolopacidae* and *Charadriidae*)鳥類，(60 件樣本數)。各地採樣數:金門 620 件、宜蘭 743 件、台南 593 件、台北 379 件、嘉義 143 件及其他地區(包括屏東、花蓮、台東)94 件樣本數。共分離出 36 株流行性感冒病毒，亞型分布為 H1N1、H4N6、H6N1、H7N1、H8N4、H10N4、H11N9 及 H14N7 等八亞型，其中 H7N1 一株於 2000 年元月分離自宜蘭五十二甲地區溼地，病毒經病原性分析結果為弱毒株。但再進行五十二甲溼地野鳥及該地範圍內家鴨場的監控皆未能再發現 H7N1 株。

關鍵字： 家禽流行性感冒，正黏液病毒，病毒監測，病毒亞型，野鴨

緒言

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，在 1878 年首先由 Perroncito 提出病例報告[4]，早期曾將本病稱之為雞瘟(fowl plague) [17]，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) [8]，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[25]，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)及神經氨酸酶(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) [3]。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[25]。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[11]。

依據國際畜疫組織(OIE)規定的標準診斷方法，診斷高病原性家禽流行性感冒病毒的方法

有三種：(1)靜脈接種感受性雞隻，接種後造成 75%以上死亡率為 HPAI。(2)分析血球凝集素蛋白水解切割位之基因序列上若出現多個鹼性氨基酸者為 HPAI 或為具有潛力成為 HPAI 的病毒。(3)若接種雞隻後造成 75%以下死亡率，但進行細胞培養病毒時如果在沒有添加胰蛋白酶(trypsin)的情況之下，病毒仍可以在細胞培養狀態下產生細胞病變，則亦屬於 HPAI[6]。

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[15]，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[7,9,14,15,20]。一般來說，野鴨是最普遍的帶毒者[7,15,19]，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[21]。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[5,9,23]。遷徙性野生水禽繁殖地通常在寒冷的冰雪地帶，是病毒保

* 抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

毒的場所，也是感染新鳥的重要來源，因此家禽流行性感帶的發生季節常與候鳥遷徙季有關[7,16,19]。

台灣位於歐亞大陸東亞區候鳥遷徙路線上，每年有成千上萬的野鴨群來台渡冬^[2]，但對於野鳥的家禽流行性感帶尚缺乏持續且有系統性的研究。台灣雖然未曾發生過高病原性家禽流行性感帶，但在 1989—1990 年謝等人[1]曾調查發現，台灣家禽場存有各種亞型的病毒，尤其由種雞場及鴨場收集到許多 AI 病毒株。但在野鳥卻一直無法獲得充足有效的樣本數，所以本研究主要目的為了解台灣野鳥在 AI 流行病學所扮演的角色，以便進一步監測與監控高病原性家禽流行性感帶，並探討野鳥引入本病可能的風險。

材料方法

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。自 1999 年 8 月起至 1999 年 12 月止至少共需採集 1,680 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[22]。野鳥排遺樣本試管內棉棒取掉後，先經 1,500rpm 低速離心去除沉渣，然後接種 0.2mL 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 35C 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帶實驗室操作手冊所述^[10]。HA 亞型鑑定方法以血球凝集抑制試驗

(hemagglutination inhibition test, HI) 進行之，NA 亞型鑑定方法以神經胺酶抑制試驗 (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。鑑定結果若有 H5 或 H7 亞型病毒株出現則進行毒力鑑定。

AI 毒力鑑定

經鑑定為 H5 或 H7 亞型之病毒則進行毒力鑑定，毒力鑑定之方法係依照國際畜疫會規訂之方法進行[6]。試驗方法分述如下：

雞隻靜脈接種法：將需鑑定毒株增殖後之新鮮尿囊液分別稀釋 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酶依存試驗：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酶，對照組添加 0.02% 胰蛋白酶，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[23]報告所設，以自動定序儀讀取核甘酸序列。利用核甘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

野鳥排遺樣本

自民國 88 年 8 月至 89 年 12 月共採樣 2,572 件野鳥排遺樣本數，其中 113 件非候鳥季樣本，其餘皆為候鳥季樣本。樣本鳥群以野生鴨科鳥類為主，鸕鶿科鳥類次之（只有採集 60 件樣本）。採樣縣市之樣本數計金門 620 件、宜蘭 743 件、台南 593 件、台北 379 件、嘉義 143 件及其他(包括屏東、花蓮、台東)94 件樣本數，各採樣區域分離 AI 病毒數如表 1 所列。

分離病毒亞型分析

共計分離得 36 株 A 型流行性感帶病毒，病毒株之 HN 亞型分佈比率高低為 H4N6(14 株)、

H10N4(8 株)、H6N1(5 株)、H14N7(4 株)、H1N1(2 株)、H7N1、H8N4 和 H11N9(各 1 株)等 8 亞型(表 2)。除了 H4N6 在各地均出現外,在台灣不同區域宜蘭、台南和台北有不同的亞型出現(表 1)。

毒力鑑定

由宜蘭樣本分離出的 1 株 H7N1 AIV 進行毒力鑑定結果為弱毒株;雞隻靜脈接種結果沒有任何雞隻死亡。接種 MDCK 細胞後,只有添加胰蛋白酶的培養液培養下有感染產生細胞病變效應(CPE),未添加胰蛋白酶的培養液培養結果無法產生 CPE。病毒 HA 切割位氨基酸分析結果屬弱毒株序列,證實本分離株並非高病原性家禽流行性感冒。

討論

台灣由於中央山脈區隔成東西兩地區,野鳥棲息不易互相往來,而台灣南北氣候差異,候鳥遷徙時間亦有差異,所以監測採樣地區大致區分為北(台北)、南(台南)和東區(宜蘭)。各區溼地監測結果表現出北、南、東各有不同的病毒亞型呈現(表 1),顯示台灣野鳥 AI 病毒監測基本上可以以此三地區劃分為固定採樣區。金門地區靠近中國大陸,是疾病境外傳入台灣的一個重要途徑,雖然在多達 620 件採樣數之下,檢測結果分離數仍為零,但因地位險要,對於該區的監測仍不可忽視。但是金門與台灣本島監測結果表現之極大差異原因,推估可能野鳥遷徙群來源繁殖地及遷徙路徑與台灣本島大不相同,反而與香港地區較相似,所以在野鳥的監測結果與香港類似(Shortridge 未發表)。

引起雞及火雞惡性傳染致死的高病原性家禽流行性感冒是這個監測計畫的重點監測對象,然因 HPAI 病毒亞型為 H5 或 H7,所以本監測於 2000 年元月在宜蘭五十二甲溼地之樣本分離到 H7N1 病毒株時,除了進行這個病毒株的毒力鑑定外,並同時對分離地溼地範圍內 3 家養鴨場進行取樣監測,以追蹤了解 H7N1 病毒是否傳播至養鴨場,結果並沒有發現傳播至家鴨場。反顧自 1998 年開始每年陸續的野鳥監測中,H7N1 病毒株每年均出現,

而宜蘭五十二甲溼地則是第二次出現,病毒追蹤結果皆未傳播於家禽場,推測原因可能這些 H7N1 病毒並未適應於新宿主-家禽,或因鳥類遷徙中時間與氣候因素使病毒活存時間減短及毒量減少等因素造成病毒沒有機會傳播及適應於家禽場的新宿主。雖然如此,但溼地範圍內的家鴨場有水池,野生水鳥經常潛入,正是家禽流行性感冒的典型傳播途徑,也是我們在家禽流行性感冒監控上的隱憂。檢視近年來世界上爆發的 HPAI 病例,如美國賓州 H5N2 (1983 年)[24]、墨西哥 H5N2 (1993 年)[13]和義大利 H7N1(1999 年)[3]的例子發現,這些 HPAI 病例病毒株皆源於先前存在該家禽場內的弱毒株轉變而來,因此對於家禽場一旦發現有 H5 或 H7 病毒存在,即使是弱毒株也不能輕忽,必要時應適時將之清除。Ito 等人亦經由實驗證實[18],野鳥 AIV 在雞隻體內經過某些特殊方式繼代後,病毒血球凝集蛋白切割位上的鹼性氨基酸可以由單個轉變為多個,毒力遂由弱病原性增強為高病原性。所以對於本監測發現的 H7N1 弱毒株雖然並未傳播至家禽場,但卻警示遷徙途徑上此病毒確實存在,台灣家禽場的生物安全措施必須注重,每年的持續監測亦不容忽視。

本監測鳥種大部分為鴨科鳥類,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]的研究發現鵝科和鸕科鳥類帶毒的基因群與野鴨不同,值得注意的是我們想監測的 H5 亞型帶毒者就是鵝科鳥類,所以我們如果加強鵝科鳥類的樣本採集,可能會有不一樣的發現,也更可以確認香港 H5N1 是否有藉野鳥入境。本監測鵝科鳥類只進行了 60 樣本數的監測,分析對鵝科鳥類採樣的困難度有:一、該科鳥類體積小,排遺量小,不容易發現。二、該科鳥類喜好於潮間帶覓食及排遺,排遺常常泡在水中,無法採集。基於以上因素,目前鵝科鳥類排遺之採樣我們只有進行繫放捕捉,然因繫放有限,捕捉量採集之樣本數似乎不足,因此對於鵝科鳥類採樣方法上的困難有待克服。

致謝

本報告承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫經費支持,台北市野鳥學會採樣員

江明亮、薛天德及李溫林等人之協助，得以使本監測計畫順利進行並完成報告，特此申謝。

參考文獻

1. 陳志豪、謝快樂、呂榮修、李永林、林地發、廖永剛、鄭明珠。本省家禽流行性感帶之研究(I)抗體調查、病毒分離及同定。台灣畜牧獸醫學會會報 53:75~88, 1988。
2. 張萬福。台灣的水鳥。東海大學環境科學研究中心出版。1973。
3. Alexander DJ. A review of influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74:3-13, 2000.
4. Alexander DJ. Ecological aspects of influenza viruses in animal and their relationship to influenza: A review. *J. R. Soc. Med* 75: 799-811, 1982.
5. Alexander DJ. Isolation of influenza A viruses from birds in Great Britain during 1980 and 1981. *Vet Rec* 111: 319-21, 1982.
6. Alexander DJ. Highly pathogenic avian influenza. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 3th ed. OIE, Paris, France, 1996.
7. Alfonso CP, Cowen BS, van Campen H. Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania. *J Wildl Dis* 31: 179-85, 1995.
8. Allan WH. Diagnostic procedures-response. *Proc. 1st. Int. Symp. Avian Influenza*, Beltsville, Maryland, USA, 167-171, 1981.
9. Austin FJ, Hinshaw VS. The isolation of influenza A viruses and paramyxoviruses from feral ducks in New Zealand. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62: 355-60, 1984.
10. Aymard-Henry M, Coleman MT, Dowdle WR, Laver WG, Schild GC and Webster RG. *Bulletin of the World Health Organization* 48: 199-202, 1973.
11. Bosh FX, Orlich M, Klenk H-D and Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95:197-207, 1979.
12. Esterday BC, et al. Influenza. In *Diseases of Poultry* (9th ed.), Ames, Iowa State University Press 532-551, 1991.
13. Garcia M, Susrez DL, Crawford JM, Latimer JW, Slemmons RD, Swayne DE, Perdue MILL, Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America. *Virus Res* 51: 115-124, 1997.
14. Hinshaw VS. The nature of avian influenza in migratory waterfowl, including interspecies transmission. In *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*. United States Animal Health Association, Athens, GA: 133-141, 1987.
15. Hinshaw VS, Webster RD and Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol* 26: 622-629, 1980.
16. Hinshaw VS, Wood JM, Webster RG, Deibel R and Turner B. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull WHO* 63: 711-791, 1985.
17. Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW. *Avian influenza eighth edition*. *Disease of Poultry* 482-495, 1984.
18. Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kuwayama M, Kawaoka Y, and Otauki K. Generation of a highly pathogenic avian influenza a virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* 75(9): 4439-4443, 2001.

19. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol* 140: 1163-72, 1995.
20. Karunakaran D, Hinshaw V, Poss P, Newman J, Halvorson D. Influenza A outbreaks in Minnesota turkeys due to subtype H10N7 and possible transmission by waterfowl. *Avian Dis* 27: 357-66, 1983.
21. Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 163: 247-250, 1988.
22. Otsuki K, Takemoto O, Fujimoto R, Yamazaki K, Kubota N, Hosaki H, Kawaoka Y, Tsubokura M. 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, 1987.
23. Scholitissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 147: 287-294, 1985.
24. Suarez DL, Senne DA. The link between the live bird markets and the Pennsylvania H5N2 avian influenza outbreak of 1983-84. *Avian Dis* 28: 317-322, 2000.
25. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-178, 1992.
26. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB and Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Archives of Virology* 130: 209-217, 1993.

表 1. 1999/8 至 2000/12 臺灣野鳥家禽流行性感冒各採樣區域分離 AI 病毒數及亞型比較

採樣區域	分離數/ 採樣數	亞型(株數)
金門	0/620	無
宜蘭	13/743	H4N6(6) 、 H6N1(5) 、 H7N1(1) 、 H8N4(1)
台南	15/593	H4N6(7) 、 H10N4(4) 、 H14N7(4)
台北	4/379	H1N1(2) 、 H4N6(1) 、 H11N9(1)
嘉義	4/143	H10N4(4)
其他 (花 蓮、台 東、屏 東)	0/94	無
總計	36/2572	H1N1(2) 、 H4N6(14) 、 H6N1(5) 、 H7N1(1) 、 H8N4(1) 、 H10N4(4) 、 H11N9(1) 、 H14N7(4)

表 2. 1999/8 至 2000/12 分離之 36 株臺灣野鳥家禽流行性感冒亞型分佈

亞型	分離數	百分比(%)
H1N1	2	5.56
H4N6	14	38.89
H6N1	5	13.89
H7N1	1	2.78
H8N4	1	2.78
H10N4	8	22.22
H11N9	1	2.78
H14N7	4	11.11
總計	36	100.00

Avian Influenza Surveillance in Wild Birds in Taiwan

Cheng^{1*}, M. C., M. S. Lee¹, S. T. Kuo¹, L. J. Ting¹, J. R. Shiau¹, W. L. Chyi², C. W. Yao³ and S.Y. Lin¹

1. National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan
2. Wild Birds Society of Taipei
3. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY

A total of 2,573 fecal samples were collected from wild birds during August 1999 and December 2000. Most of these samples were from migratory birds except 113 samples. The major populations of wild birds were ducks (*Anatidae*). Sixty samples were collected from shorebirds (*Scolopacidae* and *Charadriidae*). The surveillance areas including Kinmen (620 samples), Yilan (743), Tainan (593), Taipei (379), Guiyi (143), and three other areas (94). Thirty-six influenza viruses were isolated including eight subtypes, H1N1, H4N6, H6N1, H7N1, H8N4, H10N4, H11N9 and H14N7. The H7N1 strain was isolated from 52-Jah wetland in Yilan prefecture in June 2000. Pathogenic studies indicated that the H7N1 virus was avirulent.

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

* Corresponding Author
National Institute for Animal Health