

2007 年野鳥家禽流行性感冒監測

鄭明珠*、李敏旭、陳麗璇、劉玉彬、郭舒亭、李淑慧

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為了早期預警高病原性家禽流行性感冒 H5N1 病毒經由遷徙性水禽帶毒入境及持續性監測禽流感在台灣野鳥的帶毒情形，2007 年全年度自台北、台中、彰化、嘉義、台南、高雄、宜蘭、花蓮及金門的水鳥棲地主動性監測野鳥排遺檢體及少數死亡鳥體之被動性監測。共計進行 4,150 個採集樣本檢測，分離得 24 株禽流感病毒（分離率 0.58%）及 10 株禽類副黏液病毒，24 株禽流感病毒的亞型包括包括 H1N1(n=2)、H1N2(n=1)、H3N8(n=4)、H4N6(n=10)、H6N1(n=1)、H7N6(n=3)、H7N7(n=1)、H8N4(n=1)、H10N7(n=1)等 9 個不同亞型的病毒，皆分離自鴨科鳥類的排遺檢體。監測之樣本來自鴨科鳥類為最多（n=2,645），鸕鶿科鳥類次之（n=1,147），再其次為鷺鷥科（n=317）、鷗科（n=20）及其他鳥類（n=21）。1 月份在台南的四草溼地的一群野鴨排遺檢體中分離到 3 株 H7N6 亞型病毒，12 月份同樣在台南四草溼地的野鴨排遺分離到 1 株 H7N7 亞型病毒，這些病毒經雞隻靜脈接種及病毒 H 基因蛋白酵素切割位分析鑑定病原性結果確定均為弱毒株。本監測結果發現，本年度候鳥季期間遷徙水鳥帶毒仍屬常見的弱毒型家禽流行性感冒病毒，沒有高病原性 H5N1 帶毒鳥禽之發現，顯示當前經由候鳥帶 H5N1 病毒入侵臺灣的風險仍低。

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[21]，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~H16，N1~N9，由血球凝集素 (haemagglutinin; H) 及神經胺酸酶 (neuraminidase; N) 兩種不同抗原搭配之多種亞型組合[3]。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)。以往世界動物衛

生組織 (OIE) 將 HPAI 列為國際通報性動物傳染病 (HPNAI)，現在除了 HPAI 外，所有 H5 或 H7 亞型禽流感皆列為需通報的動物傳染病 (NAI)[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大都不會發病，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]，鸕鶿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

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

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 [5,8]。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，因此家禽流行性感冒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冒，病毒因感染人且造成 18 位感染者中有 6 位死亡。亞洲地區禽流感疫情在 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。2005 年中國大陸青海湖出現約 6,000 隻野禽感染 H5N1 死亡疫情之後，H5N1 禽流感疫情開始往歐洲及非洲一帶蔓延，陸續計有 40 多個國家的家禽或野禽發生 H5N1 感染疫情[22]。

台灣至今仍為 H5N1 高病原性禽流感的非疫區，過去曾於 2003 年 12 月在金門外海查獲走私的紅面番鴨及 2005 年 10 月在台中港查獲走私的籠鳥中檢測到 H5N1 病毒，顯示走私禽鳥可能為台灣帶來高病原性家禽流行性感冒之高風險。為了防範 H5N1 及其他高病原性家禽流行性感冒經由遷徙鳥類帶毒入境，台灣於 1998 年開始持續性地進行野鳥監測，期能早期發現早期預警。本研究之目的除了監測預警之外，同時累積數年持續性的監測結果以作為流行病學分析。

材料與方法

監測樣本：

主動監測樣本由台北市野鳥學會派員至全台各野生水鳥棲息地採樣，採樣地區主要有台北、宜蘭、彰化、嘉義、台南及金門地區溼地及河岸，因需要再增加其他監測地區。每次採樣以每群鳥 20 個排遺樣本數為原則，以棲鳥觀察及排遺大小、型態來辨別鴨科、鸕鶿科、鷺鷥及鷗科等不同種類鳥的排遺，另外進行鳥類繫放，標示腳環或足旗，並採集捕獲鳥的共泄腔拭子，保存於輸送保存液（1% gelatin in

phosphate buffer saline, pH 7.2）內。採集之樣本以冰寶低溫保存輸送至實驗室進行禽流感病毒檢測。被動監測則以死亡送檢之野生鳥類進行病毒檢測。

AI 病毒分離：

AI 病毒係以雞胚胎培養法進行分離。野鳥排遺樣本試管內棉棒取掉後，先經 1,500 g 低速離心去除沉渣，上清液以 0.45 μ m 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 0.2 mL，每個樣本接種 2 個蛋。在 35 $^{\circ}$ 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一代。

AI 病毒鑑定及亞型分析：

H 及 N 亞型分析方法係參考世界衛生組織編撰之流行性感冒實驗室操作手冊所述[9]。H 亞型鑑定方法以血球凝集抑制試驗 (hemagglutination inhibition test, HI) 進行之，而 N 亞型鑑定方法則以神經胺酶抑制試驗 (neuraminidase inhibition test, NI) 進行之，同時以設定之 H 及 N 亞型引子進行反轉錄聚合酶鏈反應方法鑑定病毒亞型[9]。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：

所分離的 AI 病毒株，其 H 亞型經鑑定為 H5 或 H7 者，則進行病毒毒力鑑定。AIV 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[24]。試驗方法分述如下：

雞隻靜脈接種法：將本次台南分離株 H7N6 及 H7N7 病毒株增殖後，增殖獲得之新鮮尿囊液以生理鹽水稀釋 10 倍，靜脈接種於 6 週齡健康雞隻，每隻雞接種 0.1 mL，每株病毒接種 10 隻雞。記錄接種後 10 日內每日雞隻發病及死亡隻數。

HA 蛋白水解切割位氨基酸分析：除了雞隻靜脈接種外，分離的 H7 亞型病毒株同時也進行 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，以自動定序儀定序核苷酸序列。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

樣本分析：

全年度共採集 4,150 個樣本檢體，樣本來自台北(n=391 佔總樣本數 9.4%)、台中 (n=364 佔 8.8%)、彰化 (n=569 佔 13.7%)、嘉義 (n=540 佔 13.0%)、台南(n=733 佔 17.7%)、高雄(n=319 佔 7.7%)、宜蘭 (n=430 佔 10.4%)、花蓮 (n=274 佔 6.6%)、屏東 (n=6 佔 0.1%) 及金門 (n=524 佔 12.6%) (表 2)，採集的鳥種包括鴨科 (n=2,645)、鸕鶿科 (n=1,147)、鷺鷥科 (n=317)、鷓鴣科 (n=20) 及其他鳥類 (n=21) (表 1)，鴨科佔總樣本數之 63.7%，鸕鶿科佔 27.6%，鷺鷥科佔 7.6%、鷓鴣科佔 0.5%及其他鳥類佔 0.5%。

盛行率分析：

全年度共分離 24 株禽流感病毒株，盛行率 0.58%。以候鳥遷徙情形將全年區分為 1-4 月候鳥離境、5-8 月非候鳥季及 9-12 月候鳥入境三個季節區段來進行分析，1-4 月監測陽性盛行率 0.27%低於全年盛行率，5-8 月盛行率 0.0%最低，9-12 月盛行率 0.96%為三季節區段中最高(表 1)。以採樣地區來進行盛行率分析由高至低分別為；台南 2.04%、高雄 0.94%、宜蘭 0.70%、金門 0.38%、嘉義 0.19%，其他台北、台中、彰化、花蓮及屏東的分離率皆為 0.0% (表 2)。以主要採樣鳥種鴨、鸕鶿、鷺鷥、鷓鴣及其他五個鳥種分群來分析其盛行率，全年度採樣監測鳥種盛行率除鴨科鳥類為 0.91%外其他鳥類皆為 0.0% (表 1)。總之本年之監測趨向仍支持鳥種與監測季節決定盛行率的重要因素。因此，以不同季節來分析鴨科鳥類帶毒的盛行率，明顯發現 9-12 月帶毒率最高，1-4 月次之，而 5-8 月仍如往年一樣，因為幾乎沒有鴨科鳥類的滯

留，所以採樣率明顯降低及無病毒分離到 (表 1)。

亞型分析：

今年度監測分離到的 24 株禽流感病毒株，經 H 及 N 亞型分析結果有 9 個不同亞型的病毒，其中以 H4N6(n=10)亞型分離數明顯高於其他亞型株所佔比例 (41.7%) 亞型 H3N8(n=4)、H7N6(n=3)、H1N1(n=2)次之，其他 H1N2(n=1)、H6N1(n=1)、H7N7(n=1)、H8N4 (n=1)、H10N7 (n=1) 亞型僅有 1 個分離數。各分離株之分離時間、地點、鳥種均列於表 3，所有分離株皆分離自鴨科鳥類。

病原性分析：

本年度分離之 H7N6 及 H7N7 兩亞型病毒株，經進行雞隻靜脈接種病原性指數分析結果皆為 0.0，沒有任何接種的雞隻發病或死亡。血球凝集蛋白切割位胺基酸序列皆為 PEIPKGR*GLF，沒有連續鹼性胺基酸排列現象。

討論

本監測進行的同年度(2007 年)內，世界其他國家如日本、香港、韓國、印尼、英國、匈牙利等歐亞不同區域國家的不同鳥禽種類仍不斷有疫情發生 [19]。經由候鳥區域性傳播的可能性雖然仍未獲有利證據證實，但是不斷的有國家發現野鳥感染死亡病例的現象，顯示 H5N1 病毒明確已有侵入野生鳥類族群的跡象，其對於自然生態的影響及造成的病毒演化的趨向仍有待觀察。許多專家經由發生國家的觀察結果均認為，家鴨潛藏感染病毒其實是造成病毒散播及控制困難的最大問題所在。

本年度樣本仍以採集鴨科鳥類的排遺為大宗，並以鴨科鳥類主要棲息地台灣南部、北部以及金門為鴨排遺的採樣的主要來源。這些地區也因鴨科鳥類為主要帶毒鳥類而有較高的流感病毒分離率。統計國外 H5N1 發生常見於雁鵝種類野生禽，這些鳥類並非台灣的例行性候鳥，偶而見於落單的迷鳥入境，因此不列為採樣標的鳥種，除非有發現死亡或發病的個體做為被動性監測病材來源。

本研究顯示，今年監測平均盛行率 (0.58%)

較去年低 (0.86%)，9-12 月的盛行率雖仍是全年的高峰 (0.96%)，但仍低於去年。各監測地區比較，本年度禽流感帶毒陽性最高在台南的候鳥棲地 (分離率 2.04%)，其次為高雄 (0.94%) 及宜蘭 (0.70%)，其他地區則低於平均盛行率或沒有陽性率。台北監測結果異於往年，主要原因可能是棲地受颱風破壞，鴨科族群減少之故。由分離陽性的樣本來源宿主分析結果如同與往年監測分析的情形一樣，監測的鳥種別仍是影響分離率的主要原因，台灣野生水禽在這個年度的禽流感帶毒仍以鴨科鳥類為主，鸕鶿科鳥類帶毒的機率極低的情形，是歐亞大陸區候鳥監測發現的共同現象，有別於北美洲的鸕鶿鳥類帶毒率，其原因為何值得探討。若僅將鴨科鳥類監測樣本的檢測情形進行統計分析，本年度的鴨科帶毒監測盛行率為 0.91%，其中 9-12 月帶毒高峰的盛行率為 1.62%，其陽性值較低於冬季北美地區 (約 10%)，但可推測其原因係氣溫的因素造成的影響。

本年度監測分離到的 24 株禽流感病毒株中，H4N6 亞型仍居最多，尤其以 10-12 月份台南的棲地有較高的 H4N6 病毒檢出率，而此棲地在 1 月份時是以 H7N6 亞型病毒檢出率較高，顯示同一棲地在不同季節有不同主要亞型病毒株循環其間。本年度我們仍然沒有監測到 H5N1 病毒或其相關的 H5 亞型病毒，顯示 H5N1 在東亞遷徙鴨群並未達可監測到的帶毒率，也許感染的鳥種別目前不在東亞遷徙鴨群，也許在疫區國家感染的鳥類發病無法長途飛行，然而監測陰性並不表示 H5N1 病毒永遠不會經由這個遷徙途徑入境台灣，因此整體候鳥在 H5N1 帶毒的角色仍有待陸續收集國際野鳥疫情及國內的持續監測。

致謝

本研究計畫 (編號 96 農科-14.2.4-衛-H2) 蒙台北市野鳥學會協助野鳥樣本採集工作及農委會動植物防疫檢疫局經費支持採樣，特此申謝。

參考文獻

- 張萬福。台灣的水鳥。東海大學環境科學研究中心出版，1973。
- 鄭明珠、李敏旭、陳麗璇、劉玉彬、郭舒亭、李淑慧。2005 年台灣家禽流行性感冒監測。家畜衛試所研報 41：1-10，2006。
- Alexander DJ. A review of influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3-13. 2000.
- Alexander DJ. Ecological aspects of influenza viruses in animal and their relationship to influenza: A review. *J R Soc Med* 75: 799-811. 1982.
- Alexander DJ. Isolation of influenza A viruses from birds in Great Britain during 1980 and 1981. *Vet Rec* 111: 319-21. 1982.
- Alfonso CP, Cowen BS, van Campen H. Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania. *J Wild Dis* 31: 179-85. 1995.
- Allan WH. Diagnostic procedures-response. *Proc. 1st. Int. Symp. Avian Influenza*, Beltsville, Maryland, USA, 167-171. 1981.
- 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.
- Aymard-Henry M, Coleman MT, Dowdle WR, Laver WG, Schild GC and Webster RG.. Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase inhibition test procedures. *Bull WHO* 48: 199-202. 1973.
- Bosh FX, Orlich M, Klenk, HD and Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 95: 197-207. 1979.
- Esterday BC. Influenza. In *Diseases of Poultry* (9th ed.), Ames, Iowa State University Press, 532-551. 1991.
- Hinshaw VS. The nature of avian influenza in migratory waterfowl, including interspecies transmission. *Proc. 2nd. Int. Symp. Avian Influenza*, Athens, GA, USA, 133-141. 1987.
- Hinshaw VS, Webster RD and Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol* 26: 622-629. 1980.
- 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.
- Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW. *Avian influenza*, 8th ed. *Dis Poult* 482-495. 1984.
- 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.
- Karunakaran D, Hinshaw V, Poss P, Newman J, Halvorson D. Influenza A outbreaks in Minnesota turkeys due to subtype H1N7 and possible transmission by waterfowl. *Avian Dis* 27: 357-66. 1983.
- 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.
- OIE: Update on avian influenza animals (Type H5), in OIE website (<http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA>)
- 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.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-178. 1992.
- WHO, H5N1 avian influenza: Timeline of major events. WHO website (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline)
- 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. *Arch Virol* 130: 209-217. 1993.
- World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 2.7.12 Avian influenza. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5th ed. OIE, Paris, France. 2004.

表 1. 2007 年台灣野鳥監測季節月份與鳥種類別盛行率分析

月份	鴨	鵝	鸚鵡	鷓鴣	其他	合計
1~4	6/1, 535* (0.39%)	0/414	0/204	0/0	0/9	6/2, 162 (0.27%)
5~8	0/0	0/97	0/0	0/20	0/0	0/117
9~12	18/1, 110 (1.62%)	0/636	0/113	0/0	0/12	18/1, 871 (0.96%)
合計	24/2, 645 (0.91%)	0/1, 147	0/317	0/20	0/21	24/4, 150 (0.58%)

* 分離數/樣本數(陽性率%)

表 2. 2007 年各監測樣點與採樣鳥種數目

分離地	鴨	鵝	鸚鵡	鷓鴣	其他	總數	AIV 分離數*	分離率 %
宜蘭	424	3	3	0	0	430	3	0.70
台北	312	51	26	0	2	391	0	0.00
台中	30	330	4	0	0	364	0	0.00
彰化	0	549	0	20	0	569	0	0.00
嘉義	480	60	0	0	0	540	1	0.19
台南	571	40	120	0	2	733	15	2.04
高雄	162	59	98	0	0	319	3	0.94
金門	517	0	1	0	6	524	2	0.38
花蓮	149	55	65	0	5	274	0	0.00
屏東	0	0	0	0	6	6	0	0.00

* 所有 AIV 皆分離自鴨。

表 3. 2007 年 1 月與 10~12 月野鳥禽流感病毒分離株

2007 年	分離數	分離地 (病毒數)	亞型 (病毒數)	鳥種
1 月	6	金門 (2)	H3N8 (1) H6N1 (1)	鴨
		嘉義 (1)	H10N7 (1)	鴨
		台南 (3)	H7N6 (3)	鴨
10-12 月	18	台南 (12)	H1N1 (1) H1N2 (1) H3N8 (1) H4N6 (8) H7N7 (1)	鴨
		宜蘭 (3)	H1N1 (1) H3N8 (1) H4N6 (1)	鴨
		高雄 (3)	H3N8 (1) H4N6 (1) H8N4 (1)	鴨

Surveillance of Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Taiwan in 2007

M. C. Cheng *, M. S. Lee, L. H. Chen, Y. P. Liu, S. T. Kuo, S. H. Lee

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The purpose of this surveillance is to make an early warning of highly pathogenic H5N1 and to realize the epidemiology of avian influenza in Taiwan's wild birds. In 2007, a total of 4,150 specimens collected from wild birds of Taipei, Taichung, Chunghua, Chayi, Tainan, Koushong, Yielan, Hwalien, and Kingmen were examined for avian influenza viruses. Twenty-four viruses were isolated (0.58% isolated rate) and subtyped as H1N1 (n = 2), H1N2 (n = 1), H3N8 (n = 4), H4N6 (n = 10), H6N1 (n = 1), H7N6 (n = 3), H7N7 (n = 1), H8N4 (n = 1) and H10N7 (n = 1). All of these viruses were isolated from fecal specimens of duck species. Three H7N6 and one H7N7 viruses of low pathogenic strains (IVPI 0.0) were isolated from field ducks in wetland of Tainan. In conclusion, H5N1 did not been isolated in this study. This results indicated that the spread of H5N1 virus into Taiwan via the migratory birds was not occurred in 2007.

Keywords: *Avian influenza, Virologic surveillance*

