

計畫編號：DOH92-DC-1013

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

跨越宿主傳播且具世界流行潛力的
流行性感冒病毒整合性偵測系統

研究報告

執行機構：台灣大學 流行病學研究所

計畫主持人：金傳春

研究人員：廖宜真、高全良、蔡敬屏、鄭明珠

執行期間：91 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

目 錄

內 容	第 頁
1. 中文摘要	3-5
2. 英文摘要	6
3. 前言	7-9
4. 材料與方法	10-12
5. 結果	13-17
6. 討論	18
7. 結論	19
8. 建議	20-22
9. 誌謝	23
10. 參考文獻	24-25

共 25 頁

中文摘要

新滋生的 A 型流行性感冒病毒(以下簡稱流感病毒)往往具有「世界流行」的潛力。香港與大陸在 1997 年、1999 年與 2003 年初至今分別爆發禽類流感病毒 H5N1 及 H9N2 感染人群的案例。經由流行病學調查發現，這些受感染者均曾接觸過禽類，而感染禽類流感病毒 H5 的高危險群為在禽類屠宰場與買賣市場的工作者、禽類的餵食者或其它接觸者以及照顧這些感染 H5N1 患者的醫護人員。因此，本研究分別在台灣北、中、南、離島的縣市，針對有大批侯鳥飛來過冬以及有禽類或豬隻的飼養或是有動物流感疫情的縣市(如宜蘭、桃園、彰化、台南、屏東，以及開放小三通之後與大陸/香港等疫區往來頻繁的金門)，建立人類的流感病毒偵測系統，並進一步探討流感病毒在台灣地區跨越宿主傳播的潛力。

由定點醫師採集症狀符合類流感定義患者的咽喉拭子，在 4 小時內以快捷送至實驗室，經狗腎細胞[Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)cells]增殖之後，再利用兩階段反轉錄聚合酶鏈反應(two-step RT-PCR)來分型別(typing)與亞型別(subtyping)：即先以所有動物 A 型流感病毒均能偵測出的 M 基因引子(52-253；244bps)以及 HA 基因引子(1144-R；600bps)來做分型(typing)，若結果為陽性，再接著以我國疾管局所提供的人類流感病毒的三套引子 [H1(HA：46-633；650bps)、H3(HA：96-1072；967bps)及

B(HA:55-127; 108bps)]做分型與亞型鑑定；，若結果為確定流感病毒但不屬於人類流感病毒 H1、H3 或 B 者，再以禽流感病毒特異引子如 H5(HA: 1144-1735; 591bps)、H6(HA: 1144-1480; 336bps)及 H9(HA1-808; 808bps)，進一步做序列分析，並結合問卷調查中「是否有動物接觸史」，分析禽/豬流感病毒感染台灣地區人群的情形。

從 2002 年 12 月到 2003 年 4 月共收集了 69 個檢體，目前分離出 12 株 H3N2(分離率為 17%)，分別是桃園 1 株、宜蘭 6 株、台南 2 株、金門 3 株，與 1 株在宜蘭分離的 B 型流感病毒，我們分別挑選出 1 株桃園、3 株金門及 4 株宜蘭及 2 株金門的 H3N2 流感病毒株，由胺基酸比較發現：(1)在 HA 的 227 位置，有 2/3 的金門為脯胺酸(Proline)而台灣的流感病毒 5/8 株則為絲胺酸(Serine)，(2)HA 的 156 位置上則有麩胺酸 Glutamine 置換成組織胺(Histidine)的變異。以演化樹分析 HA、NA、M 和 NS 四段基因，均屬於人類流感病毒。其 HA、NA 及 M 三段基因序列與 2002 年自屏東所分離到的豬流感病毒 H3N2 相似度為 80-90%；而其 HA 基因卻與台灣禽流感病毒 H3 有 75-77%的相似度，目前並無發現人類 H3N2 流感病毒有動物流感病毒的基因片段。

流感病毒在人、禽、豬身上的傳染鏈與演化方向一直是深受關切的，台灣目前雖然沒有人群感染禽流感病毒，但是每年仍會有大批候鳥飛來過

冬，因此配合豬隻與禽類流感疫情，在當地主動建立「人、禽、豬」的整合性偵測系統，將有助於早期發現疫情，並防止大流行的發生。

關鍵字: A 型流行性感冒、跨越宿主傳播、傳染鏈、偵測系統、台灣

英文摘要

This study was to investigate the changes in human flu viruses in areas where unique animal flu viruses or epidemics were isolated in Taiwan and Kinmen islet. Sentinel physicians obtained throat swabs from patients presenting with flu-like illness and two-steps RT-PCR using 5 sets of primers for matrix(M) and HA2 to detect all the animal influenza viruses and then typing/subtyping for human flu viruses. Questionnaires included travel history, animal contacts, and occupations. One flu B and eight flu A H3N2 isolates were identified in the flu season of 2002-2003, including 1, 2, 2, and 3 H3N2 in Taoyuan, Yilan, Tainan and Kinmen, respectively. Amino acid sequences of HA of human isolates revealed that Pro (P) at position 227 among most of Kinmen isolates (2/3), replaced to Ser (S) in Taiwanese isolates. In addition, one mutant from Gln (Q) to His (H) at position 156 of HA gene for 5 out of 8 H3N2 Taiwan isolates. Phylogenetic analysis demonstrated that all of the H3N2 viruses were human origin (belong to the lineage of A/Fujian/411/02), with 80-90% homology in HA, NA and M gene segments of A/Swine/PingTung/ Taiwan/199.2/02 (H3N2) and 75-77% homology in HA gene segment of A/Wild Bird/Taiwan/243/02(H3) and A/Mallard Duck/Taiwan/3.3/03(H3). Up to now, all those human derived H3N2 isolates obtained from animal epidemic areas, rural pig/avian farms and migrating birds habitats have been still “human origin” by phylogenetic analysis. In conclusion, residents in Kinmen islet frequently traveling from China need to monitor their flu A viruses that might be different from those obtained in main Taiwan island.

Keywords: Influenza A , Interspecies transmission, Transmission chain, Virological Surveillance, Taiwan

壹、前言

自 1997 年的香港新型(H5N1)禽流行性感冒病毒(以下簡稱禽流感病毒)流行，造成了 6 人死亡(30%的死亡率)[Tam, 2002]之後，研究發現從人所分離到的 H5N1 之 8 段基因，均是來自禽類[A.D.M.E. Osterhaus, 2002; Kennedy F.Shortridge, 2000; Vastag, 2002]，因此對這些流感病毒基因片段，進行基因序列分析，結果發現此 1997 年新型病毒的來源有三個方向：(1) HA 基因很類似 1996 年大陸廣東鵝農場流行的 H5N1 流感病毒[Xu et al, 1999]；(2) NA 基因卻類似 1997 年從鴨所分離到的 H6N1 流感病毒[Erich Hoffmann et al, 2000]；(3) 6 段內部基因又很類似 1997 年在香港雞市場由鵝鶉所分離到的 H9N2 流感病毒[Guan et al, 1999]。由此結果可看出，1997 年香港 H5N1 禽流感病毒的 HA 基因，相當於鵝的 H5N1 禽流感病毒的 HA 基因，而 NA 基因也相當於鴨的 H6N1 流感病毒，內部基因則來自 H9N2 的鵝鶉，這些來自不同禽類流感病毒的基因變成為供應基因發生重組滋生新病毒的來源[Guan et al, 2002]。此外，這些研究結果發現，可在人類造成流行的流感病毒基因，至今仍存留在香港地區的鳥類體內；而且一旦這些禽流感病毒在 HA 的切割處有許多鹼性的胺基酸(amino acid) (R-E-R-R-R-K-K-R)，即代表這些家禽/飛禽裡已具有「高病原性」的流感病毒[Kaverin et al, 2002]。

除了 H5N1 之外，1999 年在香港又有 2 個小孩感染到新型 H9N2 流感病毒，事實上，早在 1997 年就曾自鵝鶉身上分離到 H9N2 的病毒株[Lin et al, 2000]，經由基因比對也發現此鵝鶉的 H9N2 病毒有六段內部基因(internal genes)是與 1997 年人類與禽類的 H5N1 病毒相似[Mase et al, 2001; Guan et al, 1999]，且此 H9N2 病毒也曾在大陸感染到人[Y.Guan, 2000]。到今年元月底一名感染禽流感 H5N1 病毒的 9 歲男童隨家人赴大陸福建省探親，返回香港之後開始發燒而住院，流行病學追蹤得知他的妹妹與父親卻因肺炎而死亡，由於香港最近不少來自大陸的禽類有感染 H5N1 病毒而速展開大規模撲殺，所以香港衛生單位正全力調查感染來源是在大陸還是香港，值得台灣重視，目前已知 2003 年 H5N1 的新型病毒基因重組較 1997 年還要複雜。

美國與香港的研究發現，若多數的野鳥帶有 H5N1 病毒，極易在當地造成家禽類大量死亡[Cauthen et al, 2000]。從 1997 到 2003 年間，經由研究發現這些流感病毒株內部基因(internal genes)對流感病毒跨越宿主傳播有很重要的意義。在演化上，流感病毒若已從水禽(自然宿主)如鴨子感染到陸禽如雞隻時[Bridges WL, 2002]，從雞身上分離到的流感病毒株之毒力已增強且能造成大量雞隻死亡，此時，傳染給人類的機會也大幅提高。換言之，流感病毒從水禽到陸禽的傳播途徑中，鵝鶉(Quail)一方面扮演了中

間宿主(intermediate host)的角色；另一方面，有其演化適應之功效，禽流感病毒進出不同宿主的兩個重要基因(HA/NA genes)的改變，有助於從水禽傳到鵝鶩，而禽流感病毒的內部基因(internal gene)卻在鵝鶩傳至雞隻時扮演了重要的角色(Daniel R. Perez, 2003)，再度顯示不同禽流感病毒基因在傳染鏈中的不同角色。

在公共衛生上較重要的問題為這些來自禽類身上的H5N1病毒是否有機會傳染給當地居民呢？在1997到1998年的一個前瞻性研究(cohort study)中發現，有10%的香港畜牧人員(poultry workers)體內含有針對H5的抗體(anti-H5)，再利用巢穴病例對照研究(nested case-control)分析得知，在禽類屠宰場、買賣市場的工作者，受到H5感染有較高的危險性(OR=2.7；95%CI=1.5~4.9)，此外，餵食禽類者或其它接觸者也有較高的危險性(OR=2.4及OR=5.8；95%CI=1.4~4.1及0.9~113.6)(Y. Guan, 2002)。台灣目前雖然尚無此禽流感感染人的報告病例，但是若及早建立妥當的預警偵測系統已是刻不容緩的事。

貳、材料與方法

一、泡製培養液與咽喉部檢體的採集

以無菌棉花棒挖咽喉部細胞(內含流感病毒)，並將此棉棒放入含有 NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂、KH₂PO₄、洋膠(gelatin)、抗生素的採集瓶中，再以快捷低溫送至實驗室。

二、病毒增殖

取培養液 200ul 接種至九分滿的狗腎細胞 (Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK cells))，培養 5-6 天，並觀察有無細胞病變 (cytopathic effect, CPE) 產生，離心 1000rpm，12 分鐘，收取上清液(內含病毒)，保存於-70 。

三、血球凝集測試 Hemagglutination test

取 50ul 含病毒之上清液 + 50ul 人類 O 型紅血球懸浮液 0.75% 於 U 型盤中，靜置 40~50 分鐘，觀察有無凝集現象：陽性:無凝集，陰性:血球凝集沉澱在下面。

四、Direct Immunofluorescence Test

刮取細胞，以丙酮 (acetone) 固定，再滴上針對 A 或 B 型流感病毒抗原所設計的試劑(DAKO,K6105)，37 下靜置 15 分鐘，以磷酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) 小心清洗，風乾，用螢光顯

微鏡觀察。陽性會呈現螢光綠色。

五、RT-PCR 實驗方法：

1.RNA 萃取

由 QIAamp Viral RNA Mini Kit 萃取 RNA

2.反轉錄 (RT) 反應

以用 Promega 公司的 (ImProm-IITM Reverse Transcription System) 將 WHO 所提供之 Uni12 primer(AGCAAAAGCAGG) 複製出流感病毒的 8 段基因 cDNA。

3.多聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)：

(a)引子 (Primer) 設計：

(1) A typing (Matrix gene:52-253)

M52 : 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3'

M253 : 5'-AGGGCATTGACAAKCGTCTA-3'

(2) B typing (HA gene:55-127)

B55 : 5'-ACAAATTGAGGTGGGGTCCG-3'

B127 : 5'-ACCAGGGTAGTCAAGGGCT-3'

(3) Human H1 subtyping (HA gene:46-633)

hH1-1 : 5'-GATGCAGACACAATATGTAGAGG-3'

hH1-2 : 5'-CNCTACAGAGACATAAGGATTT-3'

(4) Human H3 subtyping (HA gene:96-1072)

hH3-1 : 5'-TCAGATTGAAGTGACTAAGCT-3'

hH3-2 : 5'-AATTTTGATGCCTGAAACCGT-3'

(5) HA typing

HA-1144 : 5'-GGAATGATAGATGGNTGGTAYGG-3'

HA-R : 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTCGAAACAAGGGTGTTTT-3'

(6) H5 subtyping

HA-1144 : 5'-GGAATGATAGATGGNTGGTAYGG-3'

H5-1735R : 5'-GTGTTTTTAAYTAMAATCTGRACTMA-3'

(b)實驗條件：

(1)~(4)組引子：

94	2 min's	}	35 cycle
94	1 min's		
55	2 min's		
72	3 min's		
72	10 min's		

(5)~(6)組 primer：

94	2 min's	}	30 cycle
94	1 min's		
50	1 min's		
72	3 min's		
72	8 min's		

六.基因序列與演化樹分析(Sequence & Phylogenetic Analysis)

將分離到的流感病毒，將進行 HA gene 或其他 Internal gene 的序列分析，並採用兩種方法來做演化樹分析【包括：(1) Neighbor-Joining method 加上 Bootstrapping 及(2) Maximum Parsimony method】，來看分離得不同病毒間的關聯性。

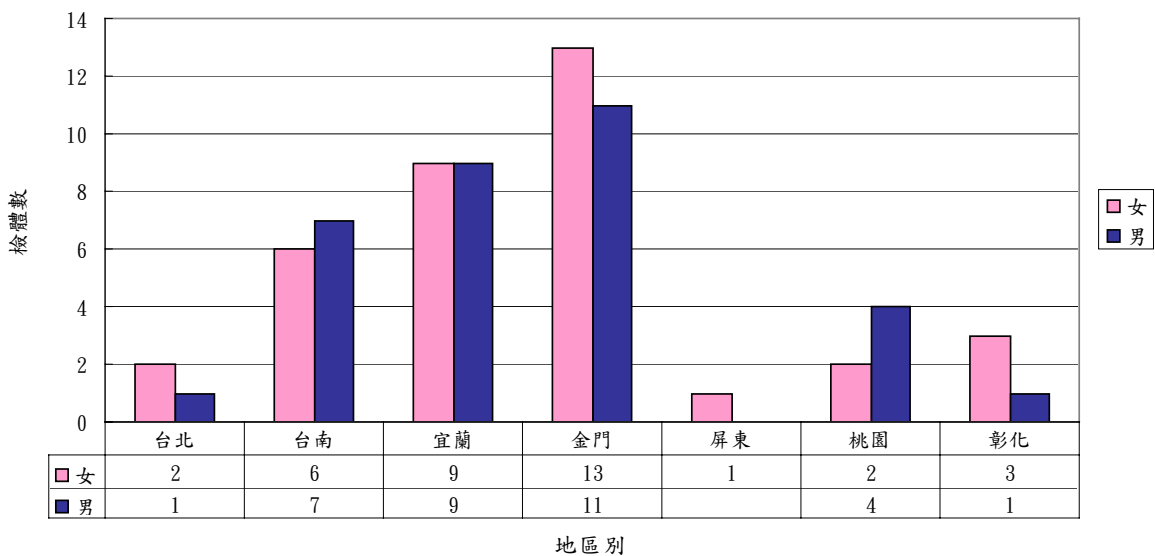
三、結果

一.檢體來源

2002 年 12 月至 2003 年 3 月為止，我們收到的地區別檢體數總共有 69 件咽喉拭子，又以一月份收到最多檢體，3 月之後因季節因素與 SARS 流行而檢體數劇降。此外，各地檢體中，以來自金門的小兒科醫師所收得的檢體數最多，其次為宜蘭，再次為台南，可惜豬、禽較多的屏東與彰化卻較少檢體(圖一)。

圖一. 2002 年 12 月至 2003 年 3 月送至台大的檢體來源:縣市別與性別分布

台灣各縣市與離島的檢體來源統計 Dec. 2002~Mar. 2003(Total 69)

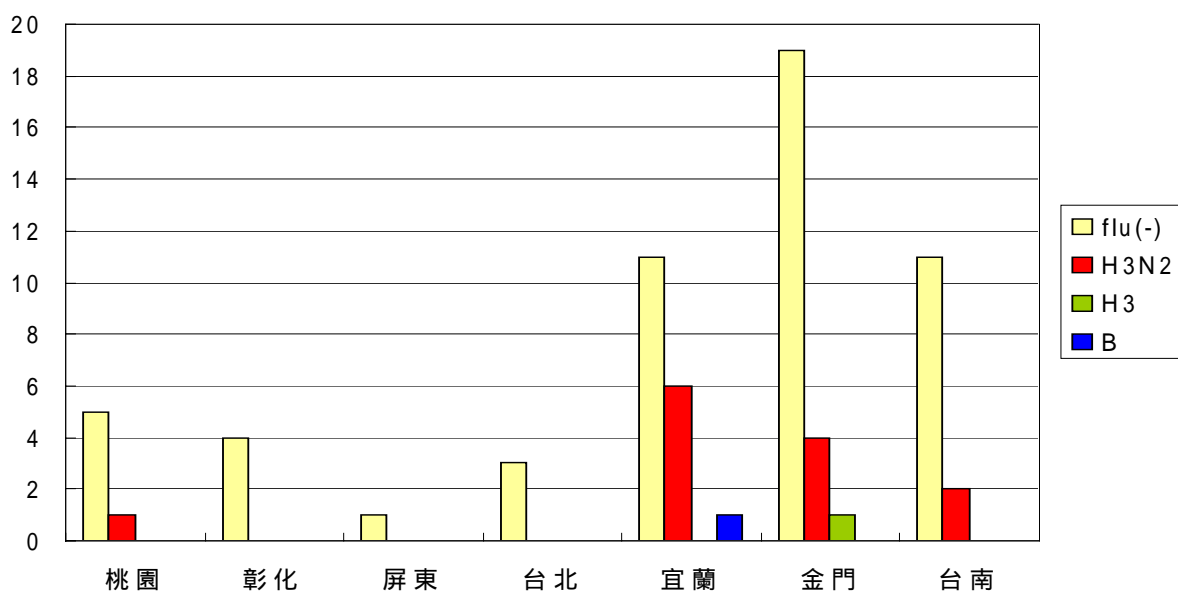


二、鑑定結果

所有檢體經過狗腎細胞(MDCK cells)培養與 RT-PCR 分型後所得到的結果為：(1) (12/69) 18% 為人類 A 型 H3N2 流感病毒，分別在桃園 1 株，

宜蘭 6 株，金門 3 株，台南 2 株；(2)有 1 株(1/69)1%是在宜蘭分離到的 B 型流感病毒；(3)金門仍有 2 株 (2/69) 3%為 H3，但是目前仍無法分出 NA 亞型。綜言之，在此 69 個檢體中，並沒有分離到人類 H1 流感病毒。去年底至今年初的流行季仍以 H3N2 流感病毒為主(圖二)。

圖二. 2002 年 12 月至 2003 年 3 月的 69 個檢體中所分離的流感病毒型別之地區分佈



三、流行病學資料分析

流感病毒分離以宜蘭所送的檢體分離率最高 6/15(40%)，金門 5/15(33%) 次之與台南 2/15(13%)再次之，男女比例為 49:51。在 H3N2 流感病毒陽性中，有一人曾在發病前旅遊福建廈門，另外，有三人住家附近有動物(雞、豬、鴿子)，但是並沒有動物接觸史。另一鑑定出 H3 流感病毒者也曾到過

中國大陸(表一)。

表一.經狗腎細胞(MDCK cells)增殖兩代與 RT-PCR 鑑定結果為「流行性感
冒病毒陽性者」之流行病學資料

台大 檢體 編號	患者 居住 縣市	流感病 毒型別 與亞型	性別	年齡 (歲)	動物		旅 遊 史
					住家 附近	發病前接 觸史	
108	桃園	H3N2	女	25	無	無	旅遊福建、廈門、香港
508	宜蘭	H3N2	女	11	無	無	ND
509	宜蘭	H3	男	6	無	無	無
513	宜蘭	H3N2	女	9	無	狗	ND
514	宜蘭	H3N2	女	9	無	無	ND
515	宜蘭	H3N2	男	3	無	狗	無
516	宜蘭	H3N2	男	15	無	無	無
517	宜蘭	B	男	11	無	狗	ND
518	宜蘭	H3N2	女	16	無	無	無
618	金門	H3N2	女	11	雞場	無	無
621	金門	H3N2	女	13	無	無	無
622	金門	H3	女	34	無	無	無
623	金門	H3	女	33	無	無	去過大陸
624	金門	H3	男	59	無	無	無
704	台南	H3N2	男	5	雞場	無	無
712	台南	H3N2	女	34	豬、雞、 鴿子	無	無

四、與台灣豬隻及禽類 H3 流感病毒做基因序列相似度之比較

2002-2003 年所分離的人類 H3N2 流感病毒之 HA1(414-924bp)
NA(562-939bp)以及 M(89-276bp)與 2002 年自屏東豬隻所分離到的 H3N2
流感病毒[A/Swine/PingTung-Taiwan/199.2/2002(H3N2)]核苷酸序列相似度

為 80-90%。另與台灣禽類 H3 流感病毒[A/Wild Bird/Taiwan/243/2002] 及 [A/Mallard Duck/Taiwan/3.3/2003] HA1(414-924bp)位置的核苷酸相似度有 75-77%，較豬隻為低(表二)。

表二.人類 H3N2 流感病毒與豬隻/禽類流感病毒核苷酸相似度之比較

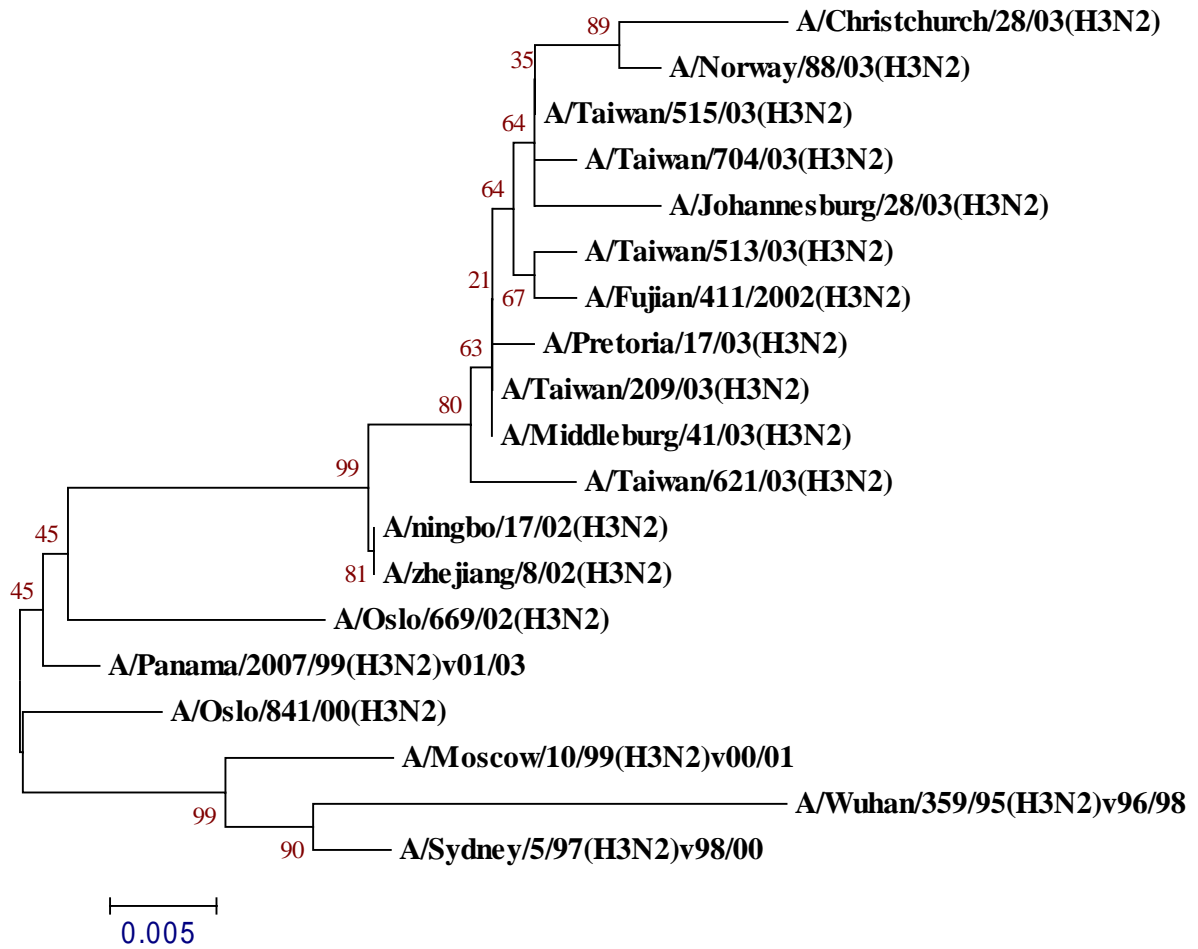
	% Homology Compared with Swine and Avian Flu Viruses in Taiwan:				
	A/Sw/PingTung-Tw/199.2/02(H3N2)			A/MD-Tw/3.3/03(H3)	A/WD-Tw/3.3/02(H3)
	HA	NA	M	HA	HA
A/ Taoyuan -Tw/108/03(H3N2)	80.6	87.7	90.9	76.9	77.3
A/Changhua-Tw/209/03(H3N2)	80.6	87.7	91.4	76.9	77.3
A/ YiLan-Tw/513/03(H3N2)	80.4	86.9	90.4	76.1	77.1
A/ YiLan-Tw/515/03(H3N2)	80.2	86.9	89.3	76.3	77.3
A/ YiLan-Tw/518/03(H3N2)	80.4	87.7	89.8	76.5	77.5
A/ Kinmen-Tw/618/03(H3N2)	80.2	87.4	90.4	76.9	76.9
A/ Kinmen-Tw/621/03(H3N2)	79.8	87.7	90.4	76.5	76.5
A/ Kinmen-Tw/622/03(H3)	80.2	ND	90.9	76.9	76.9
A/ Kinmen-Tw/623/03(H3)	78.4	ND	90.4	75.1	75.1
A/ Kinmen-Tw/624/03(H3N2)	80.2	86.9	89.3	76.1	77.1
A/ Tainan-Tw/704/03(H3N2)	80.2	87.7	89.3	76.1	77.1
A/ Tainan-Tw/712/03(H3N2)	80.0	87.4	90.4	76.1	76.9

五、演化樹分析

以 DNA Star 軟體做序列編輯，再用 Mega2 軟體進行 Neighbor-Joining method 加上 1000 次組合排列(Bootstrapping)看何者最接近，所畫出的演化樹結果：發現 2002-2003 年所分離的人類 H3N2 流感病毒八段基因中的其中四段: HA, NA, M, NS 均來自人類流感病毒(data not shown)。與世界各國的 H3N2 流感病毒 HA1(337-847bp)部分相比對結果均為「類福建株」(圖

三)。

圖三.2003 年人類 H3N2 流感病毒 HA1 基因(337-847bp)演化樹分析圖



四、討論

截至目前的流感病毒偵測作業，並沒有發現住家附近有豬隻、禽類的飼養或發病前曾接觸動物者的身上，分離到動物流感病毒的基因片段，推論可能原因為：(1)所接觸的動物有特殊流感疫情時有較多的機會發生流感病毒「跨越宿主傳播」，(2)飼養豬、禽較多的縣市，如彰化、屏東所收得檢體較少，(3)由於 SARS 症狀與流感相似，因此 SARS 流行期間都拿不到檢體，(4)對於常往來於中國大陸與香港的民眾以及畜牧工作者無法有完整系統的採集到其發病初期檢體，加上中國人往往在病程發展到很嚴重的時候才就醫，但是已不易分離到病毒了，(5)病毒分離是必須在發病三日內採得咽喉拭子，否則不易分離到病毒，未來應進一步以「血清流行病學」診斷患者體內是否有禽流感病毒抗體，才可下一完整結論。

由於中國大陸人口密集、鄉村也飼養很多動物，因此被認為是流感病毒的大溫床與流行中心(epicenter)。本研究對於曾旅遊中國大陸者進行流感病毒分離，以期能達到早期偵測的目的，研究結果發現在去年底本研究最早的指標病例即為類福建株流感病毒，而且此患者發病前曾旅遊大陸香港，但現已回美國唸書。本偵測系統藉由台灣北、中、南以及離島 7 縣市診所的小兒科醫師進行流感病毒的偵測，此兩年期間已建立分子檢測技術，且與當地小兒科醫師保持良好互信關係，未來若經費足夠可將偵測點擴及全台，以協助政府進行全面整合性流感病毒的偵測。

五、結論

A 型流行性感冒病毒的傳播在全球的公共衛生上一直是傳染病學家最重視的議題。由於此病毒可廣泛的存在各宿主(如水禽、陸禽、豬、馬、海豹與人類)中，再加上其構造為八段基因，其中 HA (H1-H15)與 NA(NA1-NA9)為表面抗原，其他六段為內部基因，因此，流感病毒是生生不息的存在自然界中，由於流感病毒為 RNA 病毒，發生點突變(point mutation)的機率較一般 DNA 病毒來得大，又因為它的 8 段均為「片段基因」而使得流感病毒間有產生「基因重組」的能力。1997 年之前，大家認為動物流感病毒不會直接傳染給人類，但可以經過中間宿主「豬隻」感染人群。但是在 1997 年 H5N1 在香港感染 18 個人並有 6 人死亡的案例發生之後，又在 1999 年發生 H9N2 在大陸與香港造成人類輕微的上呼吸道症狀，今(2003)年再度出現 H5N1 與 H7N7 感染香港與荷蘭民眾且兩者均有死亡案例，不得不慎。台灣與金門鄰近中國大陸與香港，加上兩岸民眾經商旅遊頻繁，因此，本研究設計秉持著協助政府的防疫體系進行早期新型流感病毒偵測，雖然在動物飼養眾多或有動物流感疫情的縣市暫無發現動物流感病毒傳染人群的案例，但是針對曾旅遊中國大陸者進行流感病毒基因比對，發現兩岸的貿易或旅遊的確會促進對岸正在流行的新病毒株進入台灣，並造成台灣本島的流行。

六、建議

一、衛生單位/國安局:

1. 「跨越宿主傳播」之流感病毒流行正為世界衛生組織密切注意觀察中。由於台灣進出香港與大陸人口近年增加，且香港曾發生嚴重的禽流感疫情，流感病毒易藉呼吸道傳染而帶入國內。因此建立台灣流行性感冒的病毒偵測網與快速實驗診斷已刻不容緩；同時應告知國安局主動在中國大陸禽豬混養農場處，積極採集相關檢體，以確切掌握新型流感病毒的出現及其擴散災情，本研究室誠願做此服務，以為國育才。

二、農委會:

1. 本計劃已建立整合性的北部、中部、南部以及離島（金門醫院）的偵測網，並培育年輕鄉村地區防疫研究人才，以配合台灣未來社會急需和全球流感病毒偵測網的連結。因此，建議衛生/農委會相關單位在地方上平日應互通疫訊，目前仍停留在「密件」而致地方衛生局全然無法知曉，而難以即時防治。在此懇請農委會可與台大流行病學研究所真誠合作，以確切明瞭鴨/豬農與畜牧人員的感染實況，並兼以台大醫院的醫療水準服務台灣養禽、養豬人家。
2. 農委會主動聯絡各地區獸醫/畜牧/養殖公會，舉辦流行性感冒病毒

流行前準備，並鼓勵獸醫相關人員一旦遇農場疫情發生時，可早日參與抽血防疫工作。

3. 動物疫情必須及早訂定系統化的預警性敏感度更高的指標，避免發生類似 1997 年香港禽流感導致大量農場雞隻死亡情形。
4. 凡是家有老人或慢性呼吸道疾病的畜牧/獸醫人員應配合政府防疫政策，每年流行季前接種流感疫苗，已減少動物流感病毒與人類流感病毒發生基因重組的機會，而產生毒力更高的流感病毒株。

三、教育部:

1. 金門馬祖地區因近年開放小三通之故，學童病假偵測網宜擴大大學校數，並涵蓋至初/高中為妥。

四、出入境管理局/檢疫單位:

1. 在流行性感冒流行季時，檢疫單位需與出入境管理局電腦資料連線，進行資訊管理(management information system, MIS)，應載入出入境人員住台灣何地、何時曾去大陸何處及回台灣何處。

五、其他:

1. 郊區的人流感病毒偵測地理範圍太廣，宜採參考文獻，以小兒科肺炎病例，或有接觸動物/農場/旅遊中國大陸，或有多重器官衰竭，進行深具流行病學意義的重要檢體採集。

2. 政府相關單位與學術單位通力合作，可增加年輕防疫人力親自至可能流行的疫區，及早教導小兒科醫護人員、校護進行流感採檢與運送檢體工作。
3. 以分子生物學的方法偵測流感病毒，已為世界先進國家廣泛應用，台灣應進行更深入之研究，以提升品質。所以在快速實驗診斷流程上，宜考慮時效性及與流行病學數據的串連。

七、誌謝

本研究計畫(DOH-92-DC-1013)之經費來源為疾病管制局預防接種組所補助，在此特別感謝蘇局長的大力支持、昆陽實驗室的李麗俐小姐提供流感病毒株: A/Panama/2007/99-like(H3N2)與 A/New Caledonia/20/99-like(H1N1)作為實驗診斷上的輔助。國安局補助我們實地前往金門考察與拜訪當地診所醫師的經費及陳育德先生一路的幫忙。咽喉檢體的採集全靠各縣市許多熱心的小兒科醫師合作。嚴慧玲學姊參與討論研究方向及技術上所給予意見與高敏欽先生協助建立本實驗室分子檢測技術。最後，感謝國際上研究流感的學者們，包括美國疾病管制局 Nancy Cox，香港的管儀博士及譚兆麟博士給予其專業領域上的幫助，使得此研究可以順利的進行。

八、參考文獻

- A.D.M.E. Osterhaus, J. C. d. J. (2002). H5N1 influenza in Hong Kong:virus characterizations. *Vaccine* **20**, S82-S83.
- Beare A.S and R.G. Webster (1991). Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol.* 119:37-42.
- Brotherton JM et al(2003). A large outbreak of influenza A and B on a cruise ship causing widespread morbidity. *Epidemiol. Infect.* 130(2):263-71.
- Brydak LB, Machala M et al(2003). Immune response to influenza vaccination in an elderly population. *J. Micro. Biology.* 23(3):214-22.
- Crocetti E, Amiani S et al(2001). Effectiveness of influenza vaccination in the elderly in a community in Italy. *Eru. J. Epidemio.* 17(2):163-8.
- Erich Hoffmann, J. S., Irina Leneva et al (2000). Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern china :was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J. Virol.* **74**, 6309-6315.
- Guan, Y., Shortridge, K.,F., Karu-ss, S. et al (1999). Molecular characterization of H9N2 influenza viruses:were they the donors of the internal genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9363-9367.
- Kennedy F.Shortridge, P. G., Yi Guan, Robert G.Webster et al (2000). Interspecies transmission of influenza viruses: H5N1 virus and a Hong Kong SAR perspective. *Veterinary Microbiology* **74**, 141-147.
- Masaji Mase, T. I., Yasuyuki Sanada et al (2001). Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *Journal of Virology* **75**, 3490-3494.
- Nikolai V. Kaverin, I. A. R., Natalia A. Ilyushina et al (2002). Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology* **83**, 2497-2505.
- Olshaker JS(2003). Influenza. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 21(2):353-61.
- Profeta M. L. and G. Palladino. (1986). Serological evidence of human infections with avian influenza viruses. *Arch. Virol.* 90:355-360.
- Tam, J. S. (2002). Influenza A (H5N1) in Hong Kong:an overview. *Vaccine* **20**, s77-s81.
- Thomas Rowe, Robert A. Abernathy et al (1999). Detection of antibody to avian influenza A(H5N1)virus in human serum by using a combination serologic assays. *J. Micro. Biology.* 37:937-43.
- Vastag, B. (2002). Hong Kong Flu still poses Pandemic Threat. *JAMA* **288**(19),

2391-2395.

- Xu, X., Subbarao, Cox, N.J., Guo, Y. et al (1999). Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* **261**, 15-19.
- Y. Guan, M. P., K.F.Shortridge et al (2002). H5N1 influenza viruses isolated from geese in southeastern china: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology* **292**, 16-23.
- Y.Guan, K. F. S., S.Krauss, P.S. Chin et al (2000). H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern china. *Journal of Virology* **74**, 9372-9380.
- Y.P.Lin, M. S., V.Gregory, K.Cameron et al (2000). Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses:Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **97**, 9654-9658.
- Yi Guan, K. F. S., Scott Krauss and Robert G. Webster (1999). Molecular charaterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the internal genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **96**, 9363-9367.