

2013-2014 年臺灣狂犬病病毒分子流行病學分析

許偉誠^{1*}、李敏旭¹、蔡國榮¹、涂央昌¹、張仁杰¹、胡書佳¹、李婉甄¹、莊為傑¹、李淑慧²

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所

²行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 臺灣自 1961 年宣告成為狂犬病非疫區以來，已超過 50 年沒有狂犬病病例報告。2013 年 7 月，2 例來自南投縣、1 例來自雲林縣疑似狂犬病的鼬獾檢體由臺灣大學轉送至本所狂犬病診斷實驗室，經直接螢光抗體染色法、反轉錄聚合酶連鎖反應及免疫組織化學染色法確診為狂犬病，此為我國 50 多年來首次發現之本土狂犬病病例。為瞭解臺灣狂犬病流行情形，動物防疫機關展開大規模食肉目野生動物流行病學調查。自 2013 年 7 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日為止，共計檢測 4,732 例動物病例，其中 442 例(鼬獾 439 例，鼬、白鼻心及犬各 1 例)確診為狂犬病，狂犬病陽性率分別為：鼬獾 38.82% (439/1,131)、鼬 0.58% (1/173)、白鼻心 0.47% (1/215)及犬 0.04% (1/2,651)。其他物種包括蝙蝠皆為陰性，鼬獾仍為臺灣狂犬病主要之發病動物。依狂犬病病毒核蛋白核酸序列分析結果顯示，臺灣鼬獾病毒株可明顯區分為兩群：(1)中部-南部分群(TW-MS)：包括南投縣、臺中市、雲林縣、嘉義縣、臺南市及高雄市等 6 縣市；(2)東部分群(TW-E)：花蓮縣、臺東縣及屏東縣等 3 縣市。TW-MS 及 TW-E 分群彼此間核蛋白基因序列相似性僅 91.4-93.5%。本研究結果顯示我國鼬獾狂犬病病毒已形成二獨立演化分支。

關鍵詞：狂犬病、鼬獾、分子流行病學

緒言

狂犬病是最古老的人畜共通傳染病之一，幾乎所有溫血動物都可感染，主要經咬傷後自傷口感染，病毒最後到達中樞神經，引起嚴重的神經傷害，繼而造成肌肉麻痺、昏迷和死亡。本病幾乎分佈於全世界，據世界衛生組織的統計資料，全球每年約有數萬人死於本病，以亞洲及非洲國家發生較多，犬隻仍是主要傳播動物[12]。

狂犬病病毒屬於桿狀病毒科(*Rhabdoviridae*)之 *Lyssavirus* 病毒屬。病毒顆粒大小為 75 × 180 nm，形如砲彈狀，具外膜(envelope)。病毒基因組是不分節段的單股負鏈 RNA [11]，相對分子量約為 4.6 × 10⁶ Da，大小為 10 kb 左右，約 91% 核苷酸參與組

成 5 種已知的結構蛋白，依序為核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基質蛋白(M)、糖蛋白(G)及聚合酶(L) [2]。其中核蛋白基因序列最為保守穩定，故被廣泛應用於病毒株親源性分析[6]。

臺灣自 1961 年宣告成為狂犬病非疫區以來，已超過 50 年沒有狂犬病病例報告。最後一例人的狂犬病死亡病例發生於 1958 年，最後一例動物狂犬病病例發生於 1961 年(臺北/八里/犬)。雖然 2002 年、2012 年及 2013 年零星發生 3 起人類狂犬病病例，但經調查後皆證實為境外移入之個案[3]。2013 年 7 月，2 例來自南投縣、1 例來自雲林縣疑似狂犬病的鼬獾(*Melogale moschata subaurantiaca*)檢體由臺灣大學轉送至本所狂犬病診斷實驗室，經直接螢光抗體

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

染色法、反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)及免疫組織化學染色法確診為狂犬病，此為我國50多年來首次發現之本土狂犬病病例。本研究蒐集2013-2014年由各縣市動物防疫及野生動物保育機關送檢之狂犬病陽性動物腦組織，利用反轉錄聚合酶連鎖反應與基因定序的技術分析臺灣狂犬病病毒核蛋白基因序列，以瞭解狂犬病在我國之流行情形。

材料及方法

病例來源

野生動物 (1)民眾通報各地鄉鎮公所及各縣市動物防疫機關於家中捕獲野生動物，出現異常行為，如闖入家中、攻擊行為等或拾獲之野生動物個體；(2)農委會特有生物研究保育中心及各地區林管處送檢救傷後無法存活、路邊或林道不明原因死亡之野生動物個體，皆送至本所進行狂犬病檢驗。

犬、貓 各縣市動物防疫機關定期由動物收容中心採集病弱或疑似神經症狀流浪犬、貓之腦組織，送至本所進行檢測。

蝙蝠 與臺北市蝙蝠保育協會合作，協助蒐集全國經救傷後無法存活之蝙蝠個體，送至本所進行檢測。

監測方法

送檢病例皆以直接抗體染色法(direct Fluorescent Antibody Test, 簡稱FAT)檢查 [8, 9]，經FAT確診為陽性之病例再以反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)進行核蛋白基因全長序列分析。

核酸萃取

取FAT檢測陽性之動物腦組織，以 PBS 製成10 倍乳劑，檢體乳劑以核酸抽取試劑(Nucleic acid isolation kit, Roche)及自動核酸萃取儀(MagNA Pure Compact, Roche)進行核酸萃取，最後以100 μ L引流液引流萃取之RNA。

反轉錄聚合酶連鎖反應

設計1組引子對增幅狂犬病病毒之核蛋白基因：
順向引子 N-F1 (5'-AGAAGAAGCAGACAATGTCATCT -3')及逆向引子 N-R3 (5'-GCTCTGATTGCACTCGGATTGA -3')。

該反應的反應體積為50 μ L，內含AMV反轉錄酶 4.5 U (Promega)、Taq DNA聚合酶 0.5 U (Bertec)、6.25 nmole dNTP (Bertec)、引子各20 pmole。反應於聚合酶連鎖反應儀(G-Storm)進行，以42 $^{\circ}$ C 40分鐘進行反轉錄；接著先98 $^{\circ}$ C 120秒，再進行30個循環的熱循環反應(98 $^{\circ}$ C 10秒，55 $^{\circ}$ C 15秒，68 $^{\circ}$ C 120秒)；再以68 $^{\circ}$ C，7分鐘完成反應。將RT-PCR反應產物以2%瓊脂膠體電泳解析並送交廠商(Mission Biotech)進行核苷酸定序。

序列分析

定序完成的樣本序列先以Lasergene SeqMan軟體進行序列的排列比對。確認序列無誤後，再以Lasergene MegAlign軟體將序列以Clustal W method進行序列間的排列整理。核苷酸序列之間的親緣關係，係以Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 5)軟體採用Neighbor Joining Method進行演化分析。

結果

狂犬病抗原監測

自2013年7月1日至2014年12月31日為止，共計檢測4,732例動物病例，其中442例(鼬獾439例，鼬、白鼻心及犬各1例)確診為狂犬病，狂犬病陽性率分別為：鼬獾38.82%(439/1,131)、鼬0.58%(1/173)、白鼻心0.47%(1/215)及犬0.04%(1/2,651)，其他物種包括蝙蝠、貓及食蟹獾等皆為陰性(表1)。

鼬獾狂犬病流行病學調查

依本所之統計資料顯示，2013-2014年臺灣地區除離島及嘉義市之外，各縣市皆有送檢鼬獾個體，送檢數量最多之縣市依序為臺東縣(221例)、苗栗縣(183例)及新北市(150例)；送檢數量最少之縣市依序為彰化縣(9例)、新竹市(10例)及桃園市(12例)。2014年鼬獾每月平均送檢數量較2013年大幅減少，由144(例/月)減少為21(例/月)，送檢數減少約85%。

鼬獾陽性病例以2013年8月份最多(81例)，

2014年7月份最少(1例)，陽性病例數呈現隨時間遞減之趨勢。2014年鼬獾每月平均陽性病例數量較2013年減少，由47例/月減少為13例/月，惟鼬獾狂犬病陽性率顯著升高，由2013年的32.8%升高至2014年的59.6%。確診病例遍布全臺9縣市63鄉鎮，以臺東縣病例最多(210例)，南投縣次之(72例)；陽性率以臺東縣最高(95.0%)，高雄市次之(93.8%)，鼬獾統計資料詳如圖1及表2。

狂犬病病毒核蛋白(Nucleoprotein ; N)基因序列分析

取鼬獾病例28例(除臺東縣6例及雲林縣1例外，依縣市別各取3例)、臺東縣犬1例及屏東縣白鼻心1例，共30株臺灣動物狂犬病病毒株(表3)；另由基因資料庫(NCBI Genbank)下載10株Lyssavirus病毒屬代表株及17株不同國家之狂犬病病毒株，進行病毒N基因序列分析。

依狂犬病病毒N基因序列分析結果(圖2)顯示，臺灣鼬獾狂犬病病毒株與中國大陸東南部(江西及浙江)鼬獾狂犬病病毒株序列相似度僅88-90%。臺灣鼬獾病毒株可明顯區分為兩群：(1)中部-南部分群(TW-MS)：包括南投縣、臺中市、雲林縣、嘉義縣、臺南市及高雄市等6縣市；(2)東部分群(TW-E)：花蓮縣、臺東縣及屏東縣等3縣市。TW-MS病毒株依其變異度可再細分三亞群，分別為臺中-南投亞群(MS-1)、南投-雲林-嘉義亞群(MS-2)及嘉義-臺南-高雄亞群(MS-3)；TW-E病毒株可分為花蓮-臺東亞群(E-1)及臺東-屏東亞群(E-2)。兩病毒群TW-MS及TW-E之間序列相似度僅有91.4-93.5%，約8%差異度。臺東縣犬病毒株與臺東縣鼬獾病毒株序列相似度為96-100%，屏東縣白鼻心病毒株與屏東縣鼬獾病毒株序列相似度為97-100%，由狂犬病病毒N基因核苷酸序列演化樹可知2病毒株皆來自鼬獾。

討論

狂犬病依循環(maintain)動物的不同可分為城市型(urban)狂犬病及森林型(sylvatic)狂犬病，城市型狂犬病主要循環物種為犬，森林型狂犬病則主要循環在野生動物[10]。本所自1999年起即開始進行臺灣

動物狂犬病監測，1999-2012年共檢測6,841例犬腦組織，結果皆呈陰性[1]；2013-2014年檢測犬腦2,651例及貓腦129例，除1例犬為陽性外，餘皆為陰性，故臺灣尚未發現狂犬病循環於犬族群之現象。翼手目及食肉目野生動物監測方面，檢測516例蝙蝠(2008-2014年)、1,131例鼬獾、215例白鼻心、24例食蟹獾、5例黃鼠狼及3例麝香貓腦組織，除439例鼬獾及1例白鼻心為陽性外，其餘皆為陰性。另完成食蟲目、齧齒目及靈長目等野生動物監測共380例，僅於1例鼬獾檢出狂犬病病毒，餘皆為陰性。由本所之狂犬病監測結果可知，我國發生之狂犬病屬於循環於野生動物之森林型狂犬病，且現階段病毒僅侷限在單一物種(鼬獾)，犬、白鼻心及鼬獾為偶發感染。

鼬獾主要棲息於海拔100-2,000公尺之山區[4]，2013-2014年臺灣本島各行政區除嘉義市外皆有送檢鼬獾個體，顯示鼬獾族群在臺灣分布範圍廣泛。送檢數量以臺東縣、苗栗縣、新北市、南投縣、臺中市及新竹縣較多，6縣市之送檢數占全臺的65.3%(738/1,131)。值得注意的是2014年鼬獾平均送檢量較2013年大幅減少85%，除雲林縣、屏東縣、花蓮縣及臺東縣外，其餘各縣市送檢鼬獾數量皆減少50%以上，推測可能與新增2間狂犬病初篩實驗室(國立臺灣大學獸醫專業學院1間及國立屏東科技大學獸醫學院1間)分散病例、狂犬病造成鼬獾族群數減少及民眾通報意願降低有關，應持續進行狂犬病教育宣導提升全民防疫觀念，同時委託野生動物保育機關或團體協助主動採集野外死亡之動物個體，健全我國之狂犬病監測體系。

臺灣位於歐亞大陸板塊與菲律賓海板塊之間，地殼變動與造山運動發達，導致地形多樣且複雜，山地及丘陵占全島面積70%以上[5]。臺灣鼬獾狂犬病病例分布於臺灣中部、南部及東部地區9縣市63鄉鎮，多屬山地或丘陵地形。截至2014年12月為止，尚未在臺中市與花蓮縣卓溪鄉及玉里鎮以北檢出鼬獾狂犬病病例，可能與大安溪及秀姑巒溪形成天然屏障，限制鼬獾活動範圍有關。文獻亦指出除蝙蝠外，野生動物狂犬病之分布往往受到山脈及河流等地形地貌阻

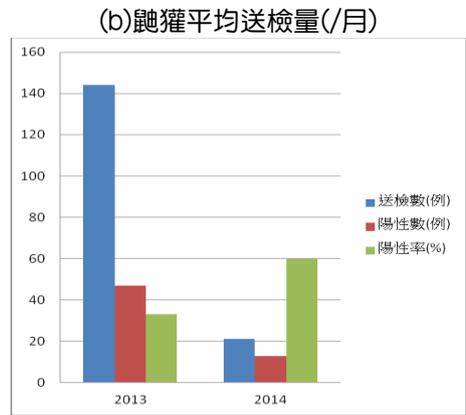
隔 [6]。

將臺灣鼬獾狂犬病病毒株與基因資料庫(NCBI Genbank)序列進行比對，結果與中國大陸犬源狂犬病病毒株序列最接近，但相似度僅90%。臺灣鼬獾狂犬病病毒株與中國大陸東南部鼬獾狂犬病病毒株序列相似度亦僅有88-90%。臺灣鼬獾狂犬病病毒株已形成TW-MS及TW-E兩分群，其中N基因序列相似度僅有91.4-93.5%，推測可能為臺灣鼬獾狂犬病病毒經長

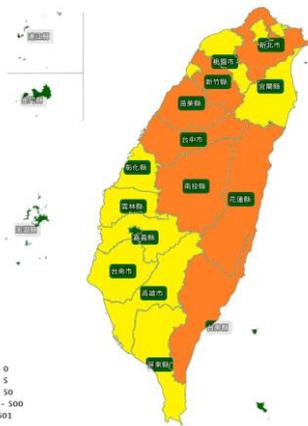
時間演化 [7] 加上中央山脈地理性隔絕造成。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 103年度「我國狂犬病中，長程科技研究之前期計畫（計畫編號：MOST 103-3114-Y-518-001）經費補助，特此致謝。



(c) 鼬獾送檢病例地理分布



(d) 鼬獾狂犬病陽性病例地理分布

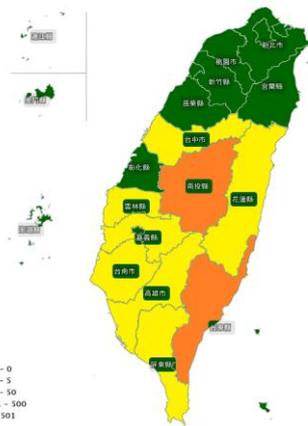


圖 1、2013-2014年臺灣鼬獾狂犬病病例流行病学調查。

2013-2014 年臺灣狂犬病病毒分子流行病學分析

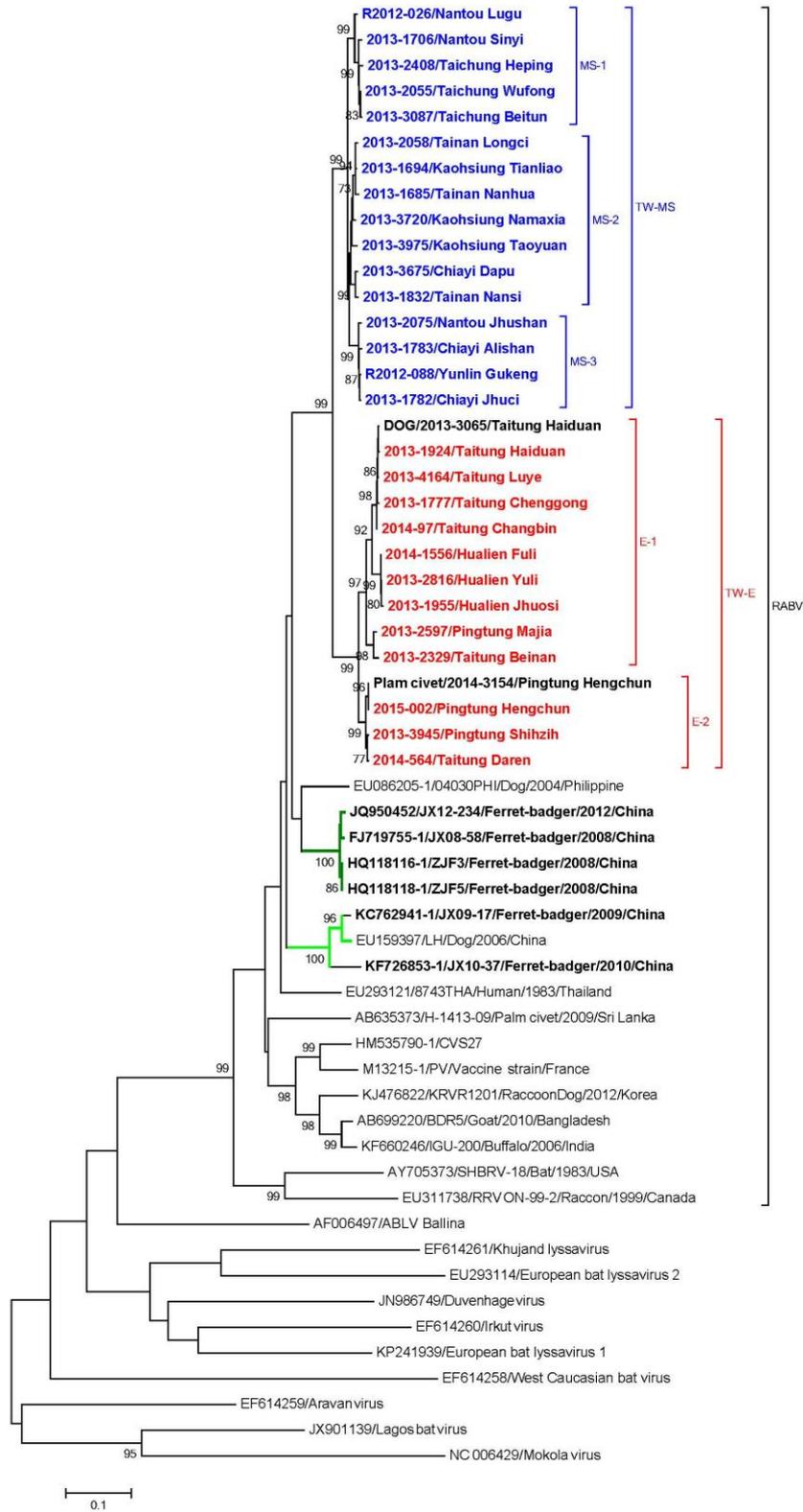


圖 2、狂犬病病毒N基因核苷酸序列演化樹。

表 1、2013-2014年狂犬病抗原監測結果。

動物別	FAT*陰性	FAT*陽性 (狂犬病陽性率)	總計
鼬獾	692	439 (38.82%)	1,131
犬	2,650	1 (0.04%)	2,651
白鼻心	214	1 (0.47%)	215
鼬鼯	172	1 (0.58%)	173
蝙蝠	194	0	194
貓	129	0	129
食蟹獾	24	0	24
麝香貓	3	0	3
黃鼠狼	5	0	5
**其他	207	0	207
總計	4,290	442	4,732

*：FAT為direct Fluorescent Antibody Test之簡稱，為狂犬病診斷之標準方法。

**：其他動物包含赤腹松鼠、臺灣條紋松鼠、臺灣長吻松鼠、大赤鼯鼠、白面鼯鼠、刺鼠、溝鼠、家鼠、臺灣高山田鼠、小黃腹鼠、臺灣鼯鼠、臺灣煙尖鼠、臺灣獼猴、山羌、臺灣野豬、蜜袋鼯及雪貂等。

表 2、2013-2014年臺灣鼬獾狂犬病病例來源及分布

縣市別	狂犬病陽性病例數/ 檢驗數 (陽性率, %)		
	2013 年	2014 年	合計
臺北市	0/ 42	0/ 4	0/ 46
新北市	0/ 143	0/ 7	0/ 150
基隆市	0/ 28	0/ 1	0/ 29
桃園市	0/ 10	0/ 2	0/ 12
新竹縣	0/ 73	0/ 9	0/ 82
新竹市	0/ 9	0/ 1	0/ 10
苗栗縣	0/ 160	0/ 23	0/ 183
臺中市	33/ 57 (58.9)	16/ 26 (61.5)	49/ 83 (59.0)
彰化縣	0/ 9	0	0/ 9
南投縣	57/ 91 (62.6)	15/ 28 (53.6)	72/ 119 (60.5)
雲林縣	16/ 21 (76.2)	10/ 16 (62.5)	26/ 37 (70.3)
嘉義縣	13/ 15 (86.7)	0	13/ 15 (86.7)
臺南市	17/ 17 (100)	5/ 8 (62.5)	22/ 25 (88)
高雄市	14/ 15 (93.3)	1/1 (100)	15/ 16 (93.8)
屏東縣	9/ 13 (69.2)	5/ 11 (45.5)	14/ 24 (58.3)
宜蘭縣	0/ 22	0/ 5	0/ 27
花蓮縣	3/ 20 (15)	15/ 23 (65.2)	18/ 43 (41.9)
臺東縣	125/ 131 (95.4)	85/ 90 (94.4)	210 /221 (95.0)
合計	287/ 876 (32.8)	152/ 255 (59.6)	439 / 1,131 (38.8)

表3、用於本研究之臺灣狂犬病病毒株病例編號、本所接獲檢體時間及採集地點。

病例編號	送檢時間	採集地點	病例編號	送檢時間	採集地點
2013-2058	2013. 08. 05	臺南市龍崎區	2014-564	2014. 03. 19	臺東縣達仁鄉
2013-1694	2013. 07. 27	高雄市田寮區	2013-3945	2013. 10. 16	屏東縣獅子鄉
2013-1685	2013. 07. 27	臺南市南化區	2015-002	2015. 01. 04	屏東縣恆春鎮
2013-3720	2013. 10. 04	高雄市那瑪夏區	2014-3154*	2014. 12. 29	屏東縣恆春鎮
2013-3975	2013. 10. 17	高雄市桃源區	2013-2329	2013. 08. 11	臺東縣卑南鄉
2013-3675	2013. 10. 03	嘉義縣大埔區	2013-2597	2013. 08. 20	屏東縣瑪家鄉
2013-1832	2013. 07. 31	臺南市楠西區	2013-1955	2013. 08. 02	花蓮縣卓溪鄉
2013-2075	2013. 08. 05	南投縣竹山鎮	2013-2816	2013. 08. 27	花蓮縣玉里鎮
2013-1783	2013. 07. 30	嘉義縣阿里山鄉	2014-1556	2014. 06. 19	花蓮縣富里鄉
R2012-088	2013. 07. 05	雲林縣古坑鄉	2014-97	2014. 01. 14	臺東縣長濱鄉
2013-1782	2013. 07. 30	嘉義縣竹崎鄉	2013-1777	2013. 07. 30	臺東縣成功鎮
R2012-026	2013. 07. 05	南投縣鹿谷鄉	2013-4164	2013. 10. 23	臺東縣鹿野鄉
2013-1706	2013. 07. 28	南投縣信義鄉	2013-1924	2013. 08. 02	臺東縣海端鄉
2013-2408	2013. 08. 13	臺中市和平區	2013-3065*	2013. 09. 09	臺東縣海端鄉
2013-2055	2013. 08. 04	臺中市霧峰區			
2013-3087	2013. 09. 11	臺中市北屯區			

*：除 2014-3154 為白鼻心、2013-3065 為犬之外，其餘病例物種皆為鼬獾。

參考文獻

1. 狂犬病監測結果。防檢局網站：
<http://www.baphiq.gov.tw/userfiles/%E6%AF%8F%E6%97%A5%E6%9B%B4%E6%96%BOPPT1031231-%E6%94%BE%E7%B6%B2%E7%AB%99%E7%94%A8.pdf>
2. 俞永新。狂犬病和狂犬病疫苗。中國醫藥科技出版社。第2版，2009。
3. 劉振軒。臺灣及大陸地區狂犬病歷史及防治回顧。疫情報導。29: s36-s41，2013。
4. 鄭錫奇、張簡琳玟。臺灣食肉目野生動物辨識手冊。行政院農業委員會特有生物研究保育中心。2015。
5. 臺灣地理。維基百科：
<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E5%8F%B0%E7%81%A3%E5%9C%B0%E7%90%86>
6. Anna Orłowska. Jan Franciszek Zmudzin _ ski. Molecular epidemiology of rabies virus in Poland. Arch Virol 159:2043-2050, 2014.
7. Chiou HY, Hsieh CH, Jeng CR, Chan FT, Wang HY, Pang VF. Molecular characterization of cryptically circulating rabies virus from ferret badgers, Taiwan. Emerg Infect Dis 20:790-798, 2014.
8. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. World Health Organization, Laboratory techniques in rabies. pp. 157-174, 1996.
9. Office International des Epizooties (OIE). Rabies. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2. 1. 13, 2009.
10. Rabies and Rabies-Related Lyssaviruses. The Center for Food and Security & public Health. Iowa State University, 2012.
11. US CDC Website: <http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>
12. WHO Website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>

Molecular Epidemiology of Rabies Viruses in Taiwan, 2013-2014

WC Hsu^{1*}, MS Lee¹, KR Tsai¹, YC Tu¹, JC Chang¹, SC Hu¹, WC Li¹, WC Chuang¹, SH Lee²

¹Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

²Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Taiwan has been considered a rabies-free country since 1961. However, three Formosan ferret-badgers (*Melogale moschata subaurantiaca*) in Nantou County and Yunlin County were diagnosed as rabies positive via direct fluorescent antibody test (FAT), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and immunohistochemistry (IHC) in July, 2013. After these first three cases were diagnosed, a massive surveillance on wild carnivores was carried out. From July 1, 2013 to December 31, 2014, 4,732 animal brain tissues were submitted to the Animal Health Research Institute and 442 cases were tested rabies-positive by FAT. The positive rates of rabies were 38.82% (439/1,131) in Formosan ferret-badger, 0.58% (1/173) in house shrew (*Suncus murinus*), 0.47% (1/215) in Formosan gem-faced civet (*Paguma larvata taivana*), and 0.04% (1/2,651) in dog. The results from the surveillance efforts showed that the disease is still restricted in wild Formosan ferret-badgers. The nucleoprotein gene based phylogenetic analysis showed that the rabies viruses isolated from Formosan ferret-badgers were clearly divided into two groups, namely the Middle and Southern group (TW-MS), covering the regions of Nantou, Taichung, Yunlin, Chiayi, Tainan, and Kaohsiung and the Eastern group (TW-E), covering the regions of Hualien, Taitung, and Pingtung. The nucleotide identities of nucleoprotein genes between TW-E subgroups and TW-MS subgroups ranged from 91.4 to 93.5%. Our study revealed that the ferret-badger-associated rabies virus in Taiwan has already evolved into two distinct strains.

KeyWords: Rabies, ferret-badger, molecular epidemiology.