

# 「112 年度野生動物傳染病原分子監測計畫」

## 113 年度期末報告

委託單位：台北市立動物園

執行單位：國立屏東科技大學獸醫學系

執行人：林昭男

中華民國 113 年 10 月

# 研究主旨

**主題：112 年野生動物傳染病原分子監測計畫-113 年度監測結果**

**緣起及動機：**

臺北市立動物園創立於 1914 年，至今已有超過一百年歷史，目前為臺灣最大動物園，位於臺北市文山區，全園總面積約 165 公頃，園區內擁有豐富及多樣的野生動物族群。近年來有小型食肉目野生動物被犬小病毒感染，而造成食慾減退、精神沉鬱或下痢等臨床症狀，此可能由於新型第二型犬小病毒感染所致，除了犬小病毒外，其他犬貓之傳染病，如犬瘟熱病毒及犬冠狀病毒感染，皆可能造成園區內小型食肉目野生動物傷亡，進而影響園內動物族群數量之穩定。

**研究目的：**

為了解動物園內小型食肉目野生動物感染犬小病毒、犬瘟熱及犬冠狀病之可能性，計畫擬分兩年針對園區內小型食肉目野生動物進行傳染病監測，於健康檢查時採集血液及眼、口、鼻及肛門拭子等臨床檢體，與例行性定期採集動物排遺進行監測。希冀由此調查能了解臺北市立動物園園內小型食肉目野生動物感染犬隻傳染性疾病之概況。

## 研究實際進度說明

112 年起至 113 年 10 月 16 日止，共收集 353 例園區動物檢體，另外包括 84 個血清樣本。送檢至國立屏東科技大學獸醫學系傳染病與分子醫學研究室進行犬小病毒、犬瘟熱病毒及冠狀病毒之檢測。

## 蒐集之資料、文獻分析

犬瘟熱病毒 (canine distemper virus, CDV) 屬於副黏液病毒科，麻疹病毒屬之病毒，為一具封套、單股 RNA 病毒，屬高度接觸傳染性疾病，此病毒感染主要引起急性或亞急性呼吸道、消化道或神經系統之臨床症狀，可感染所有哺乳類動物，2008 年時曾有野生鼬獾感染犬瘟熱之報告，其主要的組織病理學病變包括間質性肺炎及非化膿性腦膜腦炎。2016 年時，於美國田納西動物園更有園區內野生動物感染新型犬瘟熱病毒 (CDV American-4) 之報告，顯示此病亦為野生動物重要傳染病。

犬冠狀病毒 (canine coronavirus, CCoV) 為冠狀病毒科，冠狀病毒屬，Alpha 冠狀病毒之病毒，為一具封套、單股正向 RNA 病毒，其親緣與貓冠狀病毒、豬傳染性胃腸炎病毒較為相近，此病毒的感染主要造成犬隻輕微或無明顯臨床症狀之腸炎，然而 2005 年時在義大利爆發一高致病性犬冠狀病毒之病例，造成幼犬致命性腸炎。另一較新的犬冠狀病毒則屬於 Beta 冠狀病毒，主要與其他犬隻病毒混合感染造成犬舍咳。隨著全球新冠病毒的爆發，不只造成人類的大規

模感染，亦有文獻指出新冠病毒亦能感染野生動物，因此，野生動物感染冠狀病毒之情況亦值得深入探究。

第二型犬小病毒 (canine parvovirus type 2, CPV-2)為犬隻重要傳染病之一，此病毒為一小型、無封套、線性之單股 DNA 病毒。此病毒主要造成幼犬致死性心肌炎及出血性腸炎。有文獻指出早在 1900 年以前，小病毒主要感染貓隻及野生動物，於 1978 年左右，小病毒之第二結構蛋白質有 6-7 個胺基酸突變，使此病毒具有感染犬隻之能力，病毒命名為第二型犬小病毒。隨後於 1980 年時第二結構蛋白質又發生 5-6 個胺基酸突變，此為 CPV-2a，1984 年及 2000 年時第二結構蛋白質第 426 胺基酸位點又分別發生此點突變，此兩變異病毒株分別稱為 CPV-2b 及 2c。因此，現在可由第二結構蛋白質第 426 胺基酸位點來區分 2a、2b 及 2c 三個型別，臨床上此三個型別 CPV-2 感染，所造成下痢程度及腸道病變並無顯著差異。根據國內先前研究指出，2015 年以前台灣地區所感染犬小病毒之型別分布如下：北部地區以 CPV-2a 案例為主、中部地區以 CPV-2b 案例為主、CPV-2a 及 2b 兩型共同流行於南部地區為主，然而自 2015 年 1 月起，國立屏東科技大學獸醫學系林昭男教授團隊首度檢測到 CPV-2c，隨後 2015-2016 年於臨床犬隻感染犬小病毒型別進行調查研究，發現，全台灣地區不論北、中、南或東部地區皆以 CPV-2c 為主要流行型別，然而在 2014 年以前的野生小型食肉目犬小病毒感染亦以 CPV-2a 或 2b 為主，野生動物尚未有 CPV-2c 之感染，然而 2015 年後因 CPV-2c 進入台灣，造成大多數犬隻感染此一型別，

進而造成後續亦有多起野生小型食肉目動物感染 CPV-2c 的發生，包括臺北市立動物園園內之小型食肉目動物。除了犬小病毒外，犬瘟熱病毒或犬冠狀病毒皆亦會感染野生小型食肉目動物，其中又以犬瘟熱病毒感染後所造成的死亡率較為顯著。

本研究團隊於 112 年針對園區內 88 隻動物監測 (包括 81 例為小型食肉目動物、6 例鱗甲目動物及 1 例偶蹄目動物)，犬小病毒檢出陽性有 4 例，佔 4.54% (4/88)；犬冠狀病毒檢出陽性有 8 例，佔 9.09%；犬瘟熱病毒則皆為陰性。顯示園區內送檢動物此三個傳染性病原檢出率並不高，犬冠狀病毒檢出雖有 9.09%，但其病毒量皆較低。根據上一年度 (112 年)審查委員意見，美國近年亦有動物園靈長目動物感染犬瘟熱案例，因此，今年度擴大採檢物種，不再局限於小型食肉目動物，今年度亦增加多個種別動物，進行犬小病毒外，犬瘟熱病毒或犬冠狀病毒之分子檢測工作。

## 研究方法

1. 本研究以國立屏東科技大學獸醫學院動物疾病診斷中心先前已建立之犬小病毒、犬瘟熱病毒及冠狀病毒分子檢測技術進行。犬瘟熱病毒所使用引子對為 CDV-144F: 5'-GAT-AGT-TGC-TGG-ATC-GAC-3'及 CDV-144R: 5'-CCA-GAC-TCG-RGT-TTG-CAT 3'；犬冠狀病毒引子對為 CoV-2Bp: 5'-ACT-CAR-WTR-AAT-YTN-AAA-TAY-GC-3'及 CoV-4Bm: 5'-TCA-CAY-TTW-GGA-

TAR-TCC-CA-3'；犬小病毒之引子對為 PAV-124F: 5'-TAC-ATY-TAA-ATA-TGC-CAG-AA-3'及 PAV-124R: 5' GAC-CAA-GGT-GTT-ACM-ATT-TG-3'。

2. 臨床檢體採集：園內小型食肉目動物進行健康檢查時採集血液及眼、口、鼻及肛門拭子等臨床檢體，拭子採集後置入已預先加有 1 ml 的滅菌 DEPC 水之中，低溫保存備用。血液樣本則已離心後血塊或血清 (若血清量超過 0.5ml)進行後續核酸萃取。有另考量現場工作量調配例行性定期採集動物排遺，樣本採集後以 4 度 C 冷藏寄送至國立屏東科科技大學獸醫學系林昭男老師實驗室以進行後續檢驗。每年預計採集 75 隻小型食肉目動物之血液及眼、口、鼻及肛門拭子等樣本，兩年共 150 隻動物。另外，定期動物排遺收集，每次收集 3 個不同欄舍之排遺樣本，再分別進行病毒核酸檢測。兩年約 106 個排遺樣本。
3. 病毒核酸檢測：血液、肛門拭子、排遺樣本及混合拭子 (眼、口、鼻拭子)分別以羅氏自動化核酸萃取機 (MagNA Pure LC total nucleic acid isolation kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)萃取核酸後，再以螢光定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)進行病毒核酸之檢測工作。
4. 基因定序：陽性檢體將進行該陽性病毒之特定基因片段定序及分析，分析片段分別為：犬小病毒-第二結構蛋白質 (VP2)；犬瘟熱病毒-N 蛋白質；犬冠狀病毒-M 蛋白質。定序後再與國外或國內病毒株進行序列比對與分析。

5. 抗體檢測：血液離心後將血清樣本分裝及保存，以商業化抗體檢驗套組進行犬小病毒 (canine parvovirus, CPV ELISA, Demeditec)、犬瘟熱病毒 (canine distemper virus, CDV ELISA kit, AFG Bioscience)及冠狀病毒 (SARS-CoV 2 double antigen multi-species, ID Vet)抗體檢測，以分析不同疾病之抗體陽性率及力價。

## 結果與討論

### 樣本收集

112 年起至 113 年 10 月 16 日止，共收集 353 例園區動物檢體，包括 84 個血清樣本及排遺 147 個，353 例中包括 183 例為小型食肉目動物、56 例靈長目動物、44 例偶蹄目動物、16 例奇蹄目動物、11 例鱗甲目動物、6 例雙門齒目動物、6 例雞形目動物、5 例披毛目動物、4 例鶴形目動物、4 例長鼻目動物、3 例有鱗目動物、3 例龜鱉目動物、3 例鸚形目動物、3 例嚙齒目動物、2 例鶴鸵目動物、1 例鸚形目動物、1 例鵝形目動物、1 例雀形目動物及 1 例犀鳥目動物之血液、眼、口、鼻及肛門拭子等樣本。送檢至國立屏東科技大學獸醫學系傳染病與分子醫學研究室進行犬小病毒、犬瘟熱病毒及冠狀病毒之檢測。

### 分子檢測結果

PCR 檢測結果如表一，353 例送檢動物樣本中有 9 例為犬小病毒陽性

(9/353, 2.55%)、14 例為冠狀病毒陽性 (14/353, 3.97%)、犬瘟熱病毒皆為陰性。

9 例犬小病毒陽性皆為食肉目動物 (表一)，14 例冠狀病毒陽性其中有 10 例為食肉目動物、2 例為鱗甲目的穿山甲、1 例為奇蹄目犀科及 1 例為龜鱉目的陸龜科動物 (表一)。由此檢測結果顯示食肉目動物較易受犬小病毒或冠狀病毒感染，而本研究經過兩年監測 353 例動物之檢體，所有樣本皆為犬瘟熱病毒核酸陰性，顯示園區內犬瘟熱防控措施相當確實。冠狀病毒陽性之案例 (犀牛及穿山甲)，因為第二次 PCR 才呈現弱陽性，顯示其病毒含量極低，因此無法進行後續定序分析。犬小病毒或冠狀病毒陽性之食肉目動物皆圈養於不同區域，顯示陽性結果未與園區內地理位置具相關性，未來仍就陽性動物之同居動物探究是否有相關性。

表一、2023-2024 年犬小病毒、犬瘟熱病毒及冠狀病毒分子檢測結果。

目	科	數量	小病毒	犬瘟熱病毒	冠狀病毒
食肉目	獾科	45	1 (2.22)	0 (0)	1 (2.22)
	貓科	33	4 (12.12)	0 (0)	2 (6.06)
	靈貓科	8	0 (0)	0 (0)	1 (12.5)
	熊科	28	2 (7.14)	0 (0)	1 (3.57)
	浣熊科	14	0 (0)	0 (0)	2 (14.29)
	小熊猫科	12	0 (0)	0 (0)	1 (8.33)

	犬科	7	1 (14.29)	0 (0)	1 (14.29)
	鼬科	28	1 (3.57)	0 (0)	1 (3.57)
	河狸科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	鬣狗科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鱗甲目	穿山甲科	11	0 (0)	0 (0)	2 (18.18)
偶蹄目	豬科	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	牛科	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	駱駝科	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	長頸鹿科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	鹿科	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	河馬科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
奇蹄目	犀科	2	0 (0)	0 (0)	1 (50.0)
	馬科	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	獾科	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
靈長目	狐猴科	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	猴科	34	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	人猿總科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	長臂猿科	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	捲尾猴科	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)

	人科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
雙門齒目	無尾熊科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	袋鼠科	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
披毛目	食蟻獸科	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)
有鱗目	鱗科	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	遊蛇科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
龜鱉目	陸龜科	3	0 (0)	0 (0)	1 (33.33)
雞形目	雉科	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鶴形目	鶴科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
雀形目	鴉科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鸚形目	鸚鵡科	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鴉形目	鴉科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鵝形目	鵝鵝科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
長鼻目	象科	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
鶴鴕目	鴕科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	鸚鵡科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
嚙齒目	豚鼠科	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
犀鳥目	犀鳥科	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

## 血清抗體檢測結果

血清抗體檢測 84 例經商業化 ELISA 套組檢測，有 5 例為犬小病毒抗體陽性 (5/84, 5.95%)(表二)，分別為七喜 (WA024-022 蜜熊)、泰安 (WA024-038 台灣野豬)、橘子 (WA024-132 小爪水獺)、阿姓 (WA024-137 石虎)及香片 (WA024-255 小爪水獺)(表二)；另有三個為抗體疑陽性，分別為公館妹 (WA024-173 石虎)、安可 (WA024-287 豬尾猴)及新春 (WA024-477 孟加拉虎)(表二)；其餘血清樣本皆為陰性。冠狀病毒則檢測 SARS-CoV-2 之抗體，結果有 2 例為陽性 (2/84, 2.38%)(表三)，分別為喵寶 (WA024-102 山獅)及華蘭孝 (WA024-136 斑馬)，其餘血清樣本皆為陰性。所有血清樣本檢測犬瘟熱病毒之抗體皆為陰性。由此次血清抗體檢測結果可知園區內少部份曾遭受犬小病毒 (5.95%)或 SARS-CoV-2 (2.38%)感染而呈現抗體陽性。血清抗體檢測總結果附件一。進一步分析犬小病毒及冠狀病毒血清抗體陽性動物之檢體分子檢測結果，不論犬小病毒 (表二)或冠狀病毒 (表三)分子檢測皆為陰性，由此可知這些動物先前曾暴露於犬小病毒或冠狀病毒下，但現在已復原，無在排毒之情況。

表二、犬小病毒血清抗體陽性及疑陽性之樣本。

實驗室編號	動物種別	送檢日期	U 值 <sup>a</sup>	判讀	PCR 結果
WA024-022	蜜熊	113/1/4	20.86	陽性	陰性
WA024-038	台灣野豬	113/2/1	13.10	陽性	陰性

WA024-132	小爪水獺	113/4/12	18.35	陽性	陰性
WA024-137	石虎	113/4/23	14.24	陽性	陰性
WA024-173	石虎	113/5/15	10.55	疑陽性	陰性
WA024-255	小爪水獺	113/6/18	17.52	陽性	陰性
WA024-287	豬尾猴	113/7/10	9.12	疑陽性	陰性
WA024-477	孟加拉虎	113/9/2	9.69	疑陽性	陰性

<sup>a</sup> CPV ELISA 判讀標準：U 值大於 11 為陽性、介於 9-11 間為疑陽性、小於 9 為陰性。

表三、冠狀病毒血清抗體陽性及疑陽性之樣本。

實驗室編號	動物種別	送檢日期	S/P 值 <sup>a</sup>	判讀	PCR 結果
WA024-102	山獅	113/3/27	164.49%	陽性	陰性
WA024-136	斑馬	113/4/22	114.65%	陽性	陰性

<sup>a</sup> SARS-CoV-2 ELISA 判讀標準：S/P%大於 60%為陽性、介於 50-60%間為疑陽性、小於 50%為陰性。

## 研究結論

經兩年收集園區內 353 例動物檢體，分子檢測結果共有 9 個為小病毒核酸陽性(9/353, 2.55%)、14 例為冠狀病毒陽性 (14/353, 3.97%)，犬瘟熱病毒皆為

陰性。抗體檢測結果有 5.95% 為犬小病毒抗體陽性及 2.38% 為冠狀病毒陽性，顯示園區內少部份動物曾遭受犬小病毒或 SARS-CoV-2 之感染，另外目前所有樣本皆無檢測到犬瘟熱病毒核酸。

## 參考文獻

1. Anis E, Newell TK, Dyer N, Wilkes RP. 2018. Phylogenetic analysis of the wild-type strains of canine distemper virus circulating in the United States. *Virology* 15:118.
2. Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, Castagnaro M, Tempesta M. 2006. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis* 12 (3), 492-494.
3. Chang YC, Lin ZY, Lin YX, Lin KH, Chan FT, Hsiao ST, Liao JW, Chiou HY. 2021. Canine parvovirus infection in Taiwanese Pangolins (*Manis pentadactyla pentadactyla*). *Vet Pathol* 58 (4): 743-750.
4. Chen CC, Pei JC, Liao MH, Mortenson JA. 2008. Canine distemper virus in wild ferret-badgers of Taiwan. *J Wild Dis* 44 (2): 440-445.
5. Chiang SY, Wu HY, Chiou MT, Chang MC, Lin CN. 2016. Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Virology* 13 (1): 160.
6. Hoang M, Wu CN, Lin CF, Nguyen NTT, Le VP, Chiou MT, Lin CN. 2020. Genetic characterization of feline panleukopenia virus from dogs in Vietnam reveals a unique Thr101 mutation in VP2. *PeerJ* 8: e9752.
7. Hoang M, Lin WH, Le VP, Nga BTT, Chiou MT, Lin CN. 2019. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Vietnam from November 2016 to February 2018. *Virology* 16:52.

8. Hoang M, Wu HY, Lien YX, Chiou MT, Lin CN. 2018. A simpleProbe® real time PCR for differentiating the canine parvovirus type 2 genotype. *J Clin Lab Anal* 2018; e22654.
9. Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, Lin CN. 2016. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res* 12: 116.
10. Lin CN, Chan KR, Ooi EE, Chiou MT, Hoang M, Hsueh PR, Ooi PT. 2021. Animal coronavirus diseases: parallels with COVID-19 in humans. *Viruses* 13. 1507.
11. Lin CN, Chien CH, Chiou MT, Chueh LL, Hung MY, Hsu HS. 2014. Genetic characterization of type 2a canine parvoviruses from Taiwan reveals the emergence of an Ile324 mutation in VP2. *Virology* 11: 39.
12. Lin YC, Chiang SY, Wu HY, Lin JH, Chiou MT, Liu HF, Lin CN. 2017. Phylodynamic and genetic diversity of canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Int J Mol Sci* 18 (12): 2703.
13. Wang SL, Tu YC, Lee MS, Wu LH, Chen TY, Wu CH, Tsao HS, Chin SC, Li WT. 2020. Fatal canine parvovirus-2 (CPV-2) infection in a rescued free-ranging Taiwanese pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*). *Transbound Emerg Dis* 67 (3): 1074-1081.
14. Yen SL, Hoang M, Wang WC, Hung ML, Chien CH, Chiou MT, Lin CN. 2020. Detection of canine parvovirus type 2 by a commercially available in-house PCR. *Taiwan Vet J* 46 (1): 1-7.

