



公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：100801e202

行政院農業委員會林務局107年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 國立屏東科大學保育類野生動物收容中心疾病監測(1/3) (第1年/全程3年)
(英文名稱) Disease surveillance in the wildlife rescue center

計畫編號： 107農科-10.8.1-務-e2(2)

全程計畫期間：自 107年3月1日 至 109年12月31日

本年計畫期間：自 107年3月1日 至 107年12月31日

計畫主持人： 陳貞志

研究人員： 章愛梅、陳逸芸、廖慈惠、江明熹、柯建邦

執行機關： 國立屏東科技大學



1072447



一、執行成果中文摘要：

傳染性疾病為一影響環境生態平衡之重要因子，由於野生動物生性隱密之關係，要觀察野生動物是否有帶原傳染疾病或致死性疾病爆發十分不容易。收容中心為野生動物救傷之中樞站，疑似傷病之野生動物被發現後，將移送至救傷中心，因此可作為疾病監控之重點地區，預先發現狀況異常之動物。因此對於了解救傷動物感染病原之種類以及其盛行率，對於救傷動物之保育及經營管理為重要且關鍵的基礎資訊之一。目前，本計畫已針對食肉目、禽類以及爬蟲類等不同物種可能感染之高致病性病原，設計以聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction) 為基礎之檢測方式，並建立其標準篩檢流程，用於收容中心傳染性疾病管理以及野放作業之評估。其中食肉目檢測項目已成功建立小病毒 (Parvovirus)、貓泛白血球減少症病毒 (Feline panleukopenia virus, FPV)、犬瘟熱 (Canine distemper virus, CDV)；爬蟲類檢測項目已成功建立疱疹病毒 (Herpesvirus)。於107年1月至12月的研究期間，共收集10隻食肉目個體、9隻禽類個體以及2隻爬蟲類個體。其中檢驗出一隻白鼻心為小病毒陽性，經由定序發現所感染之病毒為貓泛白血球減少症病毒 (feline panleukopenia virus, FPV)，並已通報收容中心，並將動物予以隔離照料。其餘病原檢測犬瘟熱、狂犬病 (Rabies) 以及貓免疫缺乏病毒皆為陰性。禽類檢測禽流感 (Avian influenza) 之結果，目前皆為陰性。爬蟲類檢測疱疹病毒，目前皆為陰性。雖然目前檢驗大多為陰性，但疾病之爆發不可預測，應持續監測防範未然。未來本研究欲持續收集救傷個體之樣本，並統整完整之資訊以利於建立收容中心入院篩檢以及野放之檢疫項目。期待研究結果可更有效率了解帶源於救傷族群之傳染疾病種類並期望此監測結果可作為未來保育醫學研究及疾病管理之重要參考資料。

二、執行成果英文摘要：

Infectious pathogens are a critical factor to influence the stability of wild animal population and ecosystem. Therefore, for managing the impact of pathogens on wildlife, it is essential to conduct the surveillance of wildlife diseases. However, due to the secret behavior of wildlife and the limitation of natural environment, it is difficult to collect the information of pathogen distribution and assess the effect of pathogen on wildlife. The wildlife rescue center plays an important role for rehabilitating of injured free-living wildlife. Furthermore, wildlife rescue center can also contribute to the wildlife disease surveillance. In this study, our target animals are free-ranging avian, carnivore and reptile in Taiwan. Totally, we collected 13 carnivores and 9 avian individuals and adopted polymerase chain reaction (PCR) for disease detecting. Parvovirus was identified in carnivores, the positive rate of the live-individual is 7.7%. While no Canine distemper virus, Rabies and Feline immunodeficiency virus were identified in this study. All the





avian individuals were negative for avian influenza. In the future, we would collect more samples to establish the complete procedure for quarantine of newly admitted and release-individual.

三、計畫目的：

1. 了解分布於野生動物救傷(兩爬類、鳥類、小型食肉目)族群中之病原分布狀況。
2. 建立野生動物高致病性病原診斷系統。
3. 建立傷病野生動物進入收容中心園區前之傳染病檢疫項目，以利圈養管理環境中之疾病防疫。
4. 建立傷病野生動物野放時之傳染病檢疫項目，以避免病原污染野外族群。
5. 救傷食肉目動物之傳染性疾病--狂犬病帶原情形
6. 野鳥之傳染性疾--病禽流感帶原情形

四、重要工作項目及實施方法：

(一)樣本採集與保存

1. 進入收容中心之傷病動物採集EDTA抗凝血液以及黏膜樣本進行疾病篩檢，採取之樣本以QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit 進行DNA萃取，並保存於-20°C以利聚合酶連鎖反應(PCR)之檢測；以 Favorgen Blood/Cultured Cell Total RNA Mini / Maxi Kit 進行RNA萃取，並保存於-80°C，進行聚合酶連鎖反應(RT-PCR)檢測。各病原之檢測，依照病原種類設計聚合酶連鎖反應之引子，以增幅目標基因之DNA序列，並進行選定病原之篩檢。

(二)檢測方法之敏感度評估

1. 陽性樣本確立後，以質體Cloning方式進行DNA選殖及保存，另外於測定質體濃度後，以系列稀釋方法稀釋確定濃度之質體DNA並利用已建立之聚合酶連鎖反應檢測條件，確定所建立之檢測方法之敏感度，並建立經驗證之標準化流程，以應用於未來之疾病監測。

(三)序列比對及親緣關係分析

1. PCR產物送至科技公司以自動核酸定序儀(ABI3730系統)進行定序。整理後之序列於NCBI(National Center for Biotechnology Information)資料庫使用其線上序列比對工具Blast (Basic Local Alignment Search Tool)進行資料庫之序列資料之比對分析。定序結果以MEGA4™ (Molecular evolutionary genetics analysis)軟體之Alignment的功能以Clustal W法進行漸進比對，比對完後再以人工方式手動整理及校正序列。再以 Kimura雙參數模式Kimura-2-parameter model進行鹼基替換率及遺傳距離之計算。所有的選定的序列將會以最大簡約距離法(Maximum parsimony)算出遺傳差距，搭配bootstrap法將原始序列進行1000次的分析計算(Resampling)以建構親緣關係樹。





五、結果與討論：

(一)、樣本採集

本研究團對已針對各物種建立不同樣本之採集部位，詳細內容列於表一。

(二)、各病原之檢測條件

本研究團隊已建立犬瘟熱病毒、貓後天免疫缺乏病毒、小病毒以及疱疹病毒之特定目標基因建立標準檢測方法及流程，並測試其敏感性。1. 抗原檢測方法之敏感度評估本研究已針對犬瘟熱病毒、貓後天免疫缺乏病毒、小病毒以及疱疹病毒之特定目標基因設計引子(表二)建立標準檢測方法，並驗證其敏感度。上述病原之檢測皆以巢氏聚合酶連鎖反應(Nest-PCR)進行，並連續稀釋Clone Plasmid陽性樣本為100000、10000、1000、100、10以及1 gene copies/ μ l進行檢測，針對各病原所發展之檢測方法，其檢測之極限值列於表三。各病原之PCR檢測條件詳見於附錄一。

(三)、個體樣本收集

本團隊自107年1月至12月所收集食肉個體共計13隻，其中包含兩隻石虎以及11隻白鼻心，個體來源地區涵蓋台北、台南、屏東以及台東。收容禽類個體共9隻，包含黃鸝3隻、領角鴉2隻、黑鳶1隻、赤腹鷹1隻、褐鷹鴉1隻以及藍腹鷓1隻，個體來源地區涵蓋台南、屏東以及台東。另外爬蟲類個體為收容中心內部所眷養之個體共1隻蘇卡達象龜及1之古巴鬣蜥(表四)。

(四)、病原檢驗結果

食肉目

1. 犬瘟熱(Canine distemper)抗原檢測

截至11月所收集之食肉目個體共13隻，活體之臨床狀況皆為正常，並無感染犬瘟熱所出現之分泌物增多、虛弱等臨床症狀。屍體之病理解剖檢查，組織臟器並無犬瘟熱之病徵。RT-PCR檢測結果，所有樣本均為陰性。

2. 貓後天免疫缺乏病毒(Feline immunodeficiency virus)之抗原檢測截至11月所收集之食肉目個體共13隻，活體之臨床狀況皆為正常，並無感染貓後天免疫缺乏病毒所出現的免疫力低下之情形出現。屍體之病理解剖檢查，組織臟器並無感染貓後天免疫缺乏病毒之病徵。PCR檢測結果，所有樣本均為陰性。

3. 小病毒(Carnivore protoparvovirus)之抗原檢測截至11月所收集之食肉目個體共13隻，其中一隻亞成體白鼻心為小病毒陽性，陽性率為7.7% (N=13)。將陽性產物送交定序公司定序，其結果為Feline panleukopenia virus (FPV)，其中詳細之各樣本檢測結果列於表五。

禽類

1. 禽流感(Avian influenza)

107年1月截至107年11月共收集9隻野生鳥禽之樣本，至今未檢測出任何禽流感陽性





個體。

爬蟲類

1. 疱疹病毒(Herpesvirus)

107年1月截至107年11月所收集之爬蟲類個體共兩隻，並未檢測出任何陽性樣本。

四、討論與建議

過去野生動物調查由於動物找尋不易，傷病之動物會降低活動量並且躲藏或死亡於不易找尋之地點，因此常造成感染個體死亡率之低估(Gulland 1995)；又或者因發現屍體時間為晚因為屍體腐爛而無法進行診斷(Wobeser 2007, Zelck et al. 2011)。過去在澳洲動物園會進行疾病檢測的收集及統整資料來做疾病之監測(Cox-Witton et al. 2014)。而經由過去美國案例也證實，經由動物收容機構之監測有效提早偵測到西尼羅河病毒(West Nile virus)之感染，進而杜絕疾病之擴散(Pultorak et al., 2011)。今年所收容之新個體主要為小型食肉目13隻，包含石虎2隻以及白鼻心11隻個體；禽類共9隻個體，其來源多為民眾發現之救傷動物且所收容之個體多來自於野外。台灣目前對於野生動物之疾病了解尚未清楚，因此以收容中心作為野生動物疾病現況了解之監測站為一可行且極具參考價值之方法。由於台灣對於目前野生動物疾病尚未了解透徹，因此所收容之新進個體對於收容中心之疾病控管為一未知風險。過去國外收容中心曾發生過由於收容新進個體，而造成院內疾病漫延之狀況。如2011年在哥倫比亞(Colombia)一家野生動物康復中心，收容52隻捲尾猴(*Cebus capucinus*)而造成鉤端螺旋體(*Leptospira*)之爆發，其感染率高達71%而致死率則有27%，此機構利用PCR的方式快速篩檢每隻個體的檢體，並確診所感染隻個體並予以隔離(Szonyi et al., 2011)。新進之收容個體可能帶著各式病原進入到收容中心內，進而造成院內疾病的感染風險，而收容中心往往因為空間、金費之關係無法給予動物近乎於野外的環境，進而造成動物的緊迫，在長期壓力下會使得動物免疫能力下降，更加容易造成疾病的感染(Petersen et al., 2008)。然台灣地狹人廣，因此收容空間亦是台灣所面臨之問題。因此為防範疾病之爆發，進入收容中心前的疾病篩檢是極為重要的。本團隊針對台灣目前狀況選擇了對小型食肉目建立犬瘟熱病毒(*Canine distemper virus*)、貓後天免疫缺乏病毒(*Feline immunodeficiency virus*)及小病毒(*Parvovirus*)之篩檢流程；爬蟲類動物建立疱疹病毒(*Herpesvirus*)之篩檢流程；野鳥部分針對禽流感(*Avian influenza*)送交本校鄭明珠老師實驗室進行病原之檢測。犬瘟熱病毒是一急性且高自死率疾病，在國外其感染物種不僅止於狗，甚至遍及野外多種食肉目物種(Deem et al., 2008)，為一收容中心以及野外大肆傳播之病毒，其致死率僅亞於狂犬病病毒(Ettinger, 1975)。且其高自死率可能造成物種的滅絕，1985年在美國黑足鼬(*Mustela nigripes*)由於感染犬瘟熱病毒使得其族群滅絕(Williams et al., 1988)，Chen(2008)於台灣2005年分別在高雄及桃園等區域找到三隻鼬獾個體，其中一隻發現時已經死亡，另外兩隻發現時則十分虛弱，不久後死亡。經由病理切片以及RT-PCR之診斷及檢測，發現是犬瘟熱病毒感染所導致死亡，這是台灣在野生動物





身上發現犬瘟熱的首例。而台灣如石虎、黃喉貂以及食蟹獾等小型食肉目族群為野生動物食物鏈頂端，由於個體數少基因歧異度低，對於疾病的抵抗低，為防止美國黑足鼬事件重複發生，這使得犬瘟熱之檢測不容輕忽。1986年貓後天免疫缺乏病毒在美國地區的貓身上被發現(Pedersen et al., 1987)，進而擴散到全球。貓後天免疫缺乏病毒對於健康的貓隻感染率為1%-15%；然而對於虛弱且染病的貓隻其感染率則上升至3%-44% (Miyazawa & Mikami, 1993)。台灣在1990年第一次發現貓後天免疫缺乏病毒，其陽性率為2.5% (Lin et al., 1990)；然而收集1993年到1994年貓隻個體發現其陽性率為4%(Lin et al., 1995)。患病的貓隻常出現厭食、貧血、淋巴結腫大、體重減輕 (Erol & Pasa, 2013)這使得貓隻抵抗力下降容易造成其他疾病的二次感染，因此貓後天免疫缺乏病毒隻檢測亦不容輕忽。小病毒第一型 (Canine Parvovirus 1, CPV-1)早在1967年在犬隻身上被發現，在1978年發現小病毒第二型 (Canine Parvovirus 2, CPV-2)，而到了1980年幾乎遍布全球，並發現小病毒不只會感染犬隻，甚至感染貓以及其他野生食肉目動物 (Lamm et al., 2008)。由於校病毒接近100%的傳染率以及高致死率，因此被國外收容中心列為重點檢測之項目 (Steneroden et al., 2011)。而台灣小病毒盛行現況，不僅會感染犬隻以及貓，更甚至對台灣野生動物造成影響。廖靜蕙(2018)採訪本研究團隊之研究發現，路殺野生動物身上普遍感染小病毒，而在台灣保育動物石虎路殺個體身上發現遭感染的石虎，路殺的機會多於健康的石虎25倍。推測是因為病毒會造成野生動物對外界反應變遲緩，而使得容易遭到路殺或是受傷成為救傷個體，收容中心所蒐集隻小型食肉目個體多為野外來源，而台灣由於野狗野貓與野生動物活動範圍相近，可能有交叉感染之問題，因此將小病毒列為重點檢測項目。爬蟲類本團隊建立疱疹病毒之檢測流程，疱疹病毒主要會侵害消化道以及呼吸道。當個體健康時會伏於體內；但當動物處於緊迫狀態即可能引起急性之口炎、舌炎以及肺炎等症狀甚至死亡。由於許多走私救傷之個體被關於狹小，處於高度緊迫之狀態，因此了解此疾病於救傷個體的感染狀況有其重要性。針對此病原，救傷活體將採集血液、喉頭拭子；救傷屍體將採集扁桃腺、脾臟進行聚合酶連鎖反應之分析。

六、結論：

過去台灣收容中心對於收容進來的動物疾病判斷僅靠臨床徵狀之有無來判斷。然而疾病會有潛伏期，若要徹底執行收容機構之疾病防範，動物收容前的檢測以及野放前的檢測之必要性是極為重要的。雖然目前所檢驗到隻個體多為陰性，然而由於疾病的判斷不應只藉由臨床症狀的有無來決定，未來將持續與本校收容中心配合，蒐集更多個體樣本以預防疾病在收容中心內擴散，並希望日後對台灣野生動物目前疾病狀況更加了解。





七、參考文獻：

- 廖靜蕙 (民 107)。小病毒讓石虎路殺機率增加疾病預防不可忽視。環境資訊中心。民107年05月07日，取自：<http://www.nioerar.edu.tw/basis3/37/all.htm>
<https://e-info.org.tw/node/211400>
- Adams, H., Van Vuuren, M., Kania, S., Bosman, A. M., Keet, D., New, J., & Kennedy, M. (2010). Sensitivity and specificity of a nested polymerase chain reaction for detection of lentivirus infection in lions (*Panthera leo*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41 (4), 608-615.
- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T., & Onishi, K. (2012). Molecular identification of *Oesophagostomum* and *Trichuris* eggs isolated from wild Japanese macaques. *The Korean journal of parasitology*, 50 (3), 253.
- Baulu, J., Everard, C. O. R., & Everard, J. D. (1987). Leptospire in vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases*, 23 (1), 60-66.
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A. L., De Palo, P., ... & Buonavoglia, C. (2008). Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15 (3), 534-539.
- Chen, C. C., Jai-Chyi Pei, K., Liao, M. H., & Mortenson, J. A. (2008). Canine distemper virus in wild ferret-badgers of Taiwan. *Journal of wildlife diseases*, 44 (2), 440-445.
- Chen, C. C., Pei, K. J. C., Lai, Y. C., & Mortenson, J. A. (2012). Participatory epidemiology to assess sarcoptic mange in serow of Taiwan. *Journal of wildlife diseases*, 48 (4), 869-875.
- Chen, C. C., Pei, K. J. C., Lee, F. R., Tzeng, M. P., & Chang, T. C. (2011). Avian pox infection in a free-living crested serpent eagle (*Spilornis cheela*) in southern Taiwan. *Avian diseases*, 55 (1), 143-146.
- Chiou, H. Y., Yeh, K. S., Jeng, C. R., Chang, H. W., Chang, L. J., Wu, Y. H., ... & Pang, V. F. (2015). DISEASE SURVEILLANCE IN RESCUED AND ROAD-KILLED WILD-RANGING CARNIVORES IN TAIWAN. *Taiwan Veterinary Journal*, 41 (02), 73-84.
- Cox-Witton, K., Reiss, A., Woods, R., Grillo, V., Baker, R. T., Blyde, D. J., ... & Pyne, M. (2014). Emerging infectious diseases in free-ranging wildlife - Australian zoo based wildlife hospitals contribute to national surveillance. *PLoS One*, 9 (5), e95127.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., & Buonavoglia, C. (2005). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*, 33 (4), 261-267.





- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., ... &Buonavoglia, C. (2005). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of veterinary diagnostic investigation* ,17 (2), 133-138.
- Decaro, N., &Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary microbiology* ,155 (1), 1-12.
- Deem, S. L., Spelman, L. H., Yates, R. A., &Montali, R. J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife medicine* ,31 (4), 441-451.
- ETTINGER, S. J. (1975). *Textbook of veterinary internal medicine: Disease of the dog and cat*(No. 636.7 Et75t Ej. 1). Saunders College Publishing, .
- Erol, N., &Pasa, S. (2013). An Investigation of the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) Infections in Cats in Western Turkey. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41(1).
- Frisk, A. L., König, M., Moritz, A., &Baumgärtner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology* ,37 (11), 3634-3643.
- Gulland, F. M. D. (1995). The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. *Ecology of infectious diseases in natural populations* ,1 , 20-51.
- Hayes, M. A., Russel, R. G., Mueller, R. W., &Lewis, R. J. (1979). Myocarditis in young dogs associated with a parvovirus-like agent. *The Canadian Veterinary Journal* ,20 (5), 126.
- Hudson, P. J., Newborn, D., &Dobson, A. P. (1992). Regulation and stability of a free-living host-parasite system: *Trichostrongylus tenuis* in red grouse. I. Monitoring and parasite reduction experiments. *Journal of animal ecology* , 477-486.
- Jewell, N. A., &Mansky, L. M. (2000). In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *Journal of General Virology* ,81 (8), 1889-1899.
- Knobel, D. L., Cleaveland, S., Coleman, P. G., Fèvre, E. M., Meltzer, M. I., Miranda, M. E. G., ... &Meslin, F. X. (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World health Organization* ,83 , 360-368.
- GAMOH, K., SHIMAZAKI, Y., MAKIE, H., SENDA, M., ITOH, O., &INOUE, Y. (2003). The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *Journal of veterinary*





- medical science ,65 (9), 1027-1029.
- Lin, D. S., Lai, S. S., Bowman, D. D., Jacobson, R. H., Barr, M. C., & Giovengo, S. L. (1990). Feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, *Toxoplasma gondii*, and intestinal parasitic infections in Taiwanese cats. *British Veterinary Journal* ,146 (5), 468-475.
- LIN, J. A., CHENG, M. C., INOSHIMA, Y., TOMONAGA, K., MIYAZAWA, T., TOHYA, Y., ... & MIKAMI, T. (1995). Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in cats in Taiwan in 1993 and 1994. *Journal of Veterinary Medical Science* ,57 (1), 161-163.
- Luttge, B. G., & Freed, E. O. (2010). FIV Gag: virus assembly and host-cell interactions. *Veterinary immunology and immunopathology* ,134 (1-2), 3-13.
- Marshall, J. A., Healey, D. S., Studdert, M. J., Scott, P. C., Kennett, M. L., Ward, B. K., & Gust, I. D. (1984). Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Australian veterinary journal* ,61 (2), 33-38.
- Macdonald, D. W. (1993). Rabies and wildlife: a conservation problem?. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* ,60 , 351-351.
- Miyazawa, T., & Mikami, T. (1993). Biological nature of feline immunodeficiency virus. *Journal of Veterinary Medical Science* , 55(4), 519-526.
- Manrique, M. L., Rauddi, M. L., González, S. A., & Affranchino, J. L. (2004). Functional domains in the feline immunodeficiency virus nucleocapsid protein. *Virology* ,327 (1), 83-92.
- Manzoor, S., & Jamil, A. (2013). Canine parvovirus associated with bloody diarrhea in Labrador retriever pup. *Res. J. Vet. Pract* ,1 , 34-35.
- Monteiro, F. L., Cargnelutti, J. F., Martins, M., Anziliero, D., Erhardt, M. M., Weiblen, R., & Flores, E. F. (2016). Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions. *Brazilian journal of microbiology* ,47 (4), 876-881.
- Mylonakis, M. E., Kalli, I., & Rallis, T. S. (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports* ,7 , 91.
- Nandi, S., & Kumar, M. (2010). Canine parvovirus: current perspective. *Indian Journal of virology* ,21 (1), 31-44.
- Pedersen, N. C., Ho, E. W., Brown, M. L., & Yamamoto, J. K. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* ,235 (4790), 790-793.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., López, I., & Hernández, M.





- (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary microbiology* ,124 (1-2), 147-152.
- Pultorak, E., Nadler, Y., Travis, D., Glaser, A., McNamara, T., &Mehta, S. D. (2011). Zoological institution participation in a West Nile virus surveillance system: implications for public health. *public health* , 125(9), 592-599.
- Randall, D. A., Williams, S. D., Kuzmin, I. V., Rupprecht, C. E., Tallents, L. A., Tefera, Z., ... &Laurenson, M. K. (2004). Rabies in endangered Ethiopian wolves. *Emerging infectious diseases* ,10 (12), 2214.
- Steneroden, K. K., Hill, A. E., &Salman, M. D. (2011). A needs-assessment and demographic survey of infection-control and disease awareness in western US animal shelters. *Preventive veterinary medicine* ,98 (1), 52-57.
- Tompkins, D. M., &Wilson, K. (1998). Wildlife disease ecology: from theory to policy. *Trends in ecology &evolution* ,13 (12), 476-478.
- Tong, S., Chern, S. W. W., Li, Y., Pallansch, M. A., &Anderson, L. J. (2008). Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* ,46 (8), 2652-2658.
- Tabor, B. (2011). Canine parvovirus. *Veterinary Technician*. Vetlearn. com , E1-E10.
- van de Rakt, K. S. D. (2013). DETECTION AND CHARACTERIZATION OF HERPES VIRUS IN WILDLIFE SPECIMENS (Master's thesis).
- Vadlejch, J., Petrtýl, M., Zaichenko, I., adková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., &Moravec, M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable?. *Parasitology research* ,109 (5), 1387-1394.
- Williams, E. S., Thome, E. T., Appel, M. J., &Belitsky, D. W. (1988). Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of wildlife diseases* ,24 (3), 385-398.
- Wilkes, R. P., Kania, S. A., Tsai, Y. L., Lee, P. Y. A., Chang, H. H., Ma, L. J., ... &Wang, H. T. T. (2015). Rapid and sensitive detection of feline immunodeficiency virus using an insulated isothermal PCR-based assay with a point-of-need PCR detection platform. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* ,27 (4), 510-515.
- Wobeser, G. A. (2007). *Disease in wild animals* (pp. 53-82). Berlin, Germany: Springer.
- Zelck, U. E., Bialek, R., &Weiß, M. (2011). Molecular phylogenetic analysis of *Enterobius vermicularis* and development of an 18S ribosomal DNA-targeted diagnostic PCR. *Journal of clinical microbiology* .







表一、本表列出此次研究所檢測之病原以及檢測之樣本類型。

物類類別	檢測病原項目	檢測樣本
食肉目	犬瘟熱病毒(Canine distemper virus)	血清
	貓後天免疫缺乏病毒(Feline immunodeficiency virus)	活體:EDTA 血液
	小病毒(Parvovirus)	活體:EDTA 血液、直腸拭子
野鳥	禽流感(Avian influenza)	活體:喉頭、泄殖腔拭子
爬蟲類	蛙病毒(Ranavirus)	活體:血液、喉頭拭子
	疱疹病毒(Herpesvirus)	活體: 血液、喉頭拭子





表 二、本表列出個檢測病原之目標基因及其引子

檢測病原	目標基因	PCR 形式	引子(5'-3')	產物長度 (bps)
Parvovirus	VP2 gene	Nested PCR	Frist time ACACAYACATGGCAAACAAATAGA ACTGGTGGTACATTATTTAATGCAG	672
			Second time AAATAGAGCATTGGGCTTACCACCATTTTT ATTCCTGTTTTACCTCCAATTGGATCTGTT	484
FIV	gag & pol gene	Nested-PCR	Frist time TGGCCWYTAWCWAATGAAAARATWGAAGC GTATTYTCTGCTTTTTTCTTYTGTCTA	1000
			Second time TGAAAARATWGAAGCHTTAACAGAMATAG GTAATTTTRTCTTCHGGNGTYTCAAATCCCC	576
CDV	pol gene	Semi-nested PCR	Frist time TCNTTYTTTAGRASNTTYGGNCAYCC CKCATTTTTGTANGTCATYTTNGCRAA	700
			Second time GCYATATTYTGTGGRATAATHATHAAYGG CKCATTTTTGTANGTCATYTTNGCRAA	500
Herpesvirus	DNA directed DNA polymerase	Nested-PCR	Frist time GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	800
			Second time GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	215-310





表 三、本表列出已成功建立標準檢測方法之病原的敏感度測試結果。

檢測病原	極限值(gene copies/ μ l)
犬瘟熱病毒	10 gene copies/ μ l
貓後天免疫缺乏病毒	1 gene copies/ μ l
小病毒	1 gene copies/ μ l
疱疹病毒	10 gene copies/ μ l

表 四、本表列出本研究107年1月至12月所收集之個體資料。

動物類別	物種	性別		年齡	
		公	母	成體	亞成體
食肉目	石虎	1	1	1	1
	白鼻心	7	4	2	9
禽類	黃鸝	3 ^U		1	2
	黑鳶	1 ^U		1	0
	赤腹鷹	1 ^U		0	1
	領角鴉	2 ^U		2	0
	褐鷹鴉	1 ^U		1	0
	藍腹鵝	0	1	1	0
爬蟲類	蘇卡達象龜	1	0	1	0
	古巴鬣蜥	1	0	1	0

U=Unknown，未知。





表 五、本表列出本研究107年1月至11月食肉目動物小病毒之檢測結果。

物種	陽性個體	陰性個體	採樣位置	陽性率(%)
石虎	0	2		0
白鼻心	1	10	B(1/11) R(1/11)	7.7%

B=Blood，EDTA 血液；

R=Rectal swab，直腸拭子。





附錄一、各病原檢測之 PCR 條件

1. 犬瘟熱病毒 Semi-Nested PCR 檢測條件

<第一次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
2x genedirex Reaction Mix	2x → 1x	10μl x □
RES-MOR-HEN-F1	10 uM→0.3uM	0.6μl x □
RES-MOR-HEN-R	10 uM→0.3uM	0.6μl x □
RT/Hotstar Tag Mix		0.4μl x □
RNA		5μl
RNA free water		3.4μl x □

說明：□為樣本數+1

<第一次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
50°C	30min	1 cyc
94°C	2m	1cyc
94°C	30 s	40cyc
52°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	7 m	1cyc

<第二次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
10 Takara Buffer Mix	10x → 1x	2μl x □
RES-MOR-HEN-F2	10 uM→0.3uM	0.6μl x □
RES-MOR-HEN-R	10 uM→0.3uM	0.6μl x □
Takara Tag	5U/ul → 1.25 U/ul	0.25μl x □
FIRST 跑完的 DNA		5μl
RNA free water		11.55 μl x □

說明：□為樣本數+1





<第二次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
94°C	3m	1cyc
94°C	30 s	40cyc
52°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	7 m	1cyc





2. 貓免疫缺乏病毒檢測之 PCR 條件

貓免疫缺乏病毒 PCR 檢測為應用 Semi-Nested PCR。

<第一次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Takara Buffer	10x→1x	2 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer P1F	10 μ M→0.4 μ M	0.8 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer P2R	10 μ M→0.4 μ M	0.8 μ l x <input type="checkbox"/>
DNTP	2.5mM→0.2mM	1.6 μ l x <input type="checkbox"/>
Takara Taq	5U/uL → 1.5U/50 uL	0.12 μ l x <input type="checkbox"/>
DNA		2 μ l
DDW		12.68 μ l x <input type="checkbox"/>

說明：為樣本數+1

<第一次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
94°C	3m	1cyc
94°C	30 s	35cyc
52°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	10 m	1cyc





<第二次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Takara Buffer	10x→1x	2 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer P2F	10 μ M→0.4 μ M	0.8 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer P1R	10 μ M→0.4 μ M	0.8 μ l x <input type="checkbox"/>
DNTP	2.5mM→0.2mM	1.6 μ l x <input type="checkbox"/>
Takara Taq	5U/uL → 1.5U/50uL	0.12 μ l x <input type="checkbox"/>
DNA		2 μ l
DDW		12.68 μ l x <input type="checkbox"/>

說明：為樣本數+1

<第二次 PCR 溫度條件>:

溫度	時間	循環數
94°C	3m	1cyc
94°C	30 s	35cyc
50°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	10 m	1cyc





3. 小病毒抗原檢測之 PCR 條件

小病毒檢測方式為應用 Nested PCR 方式

<第一次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Takara Buffer	10x→1x	2μl x □
Primer M10	10μM→0.3μM	0.6μl x □
Primer M11	10μM→0.3μM	0.6μl x □
DNTP	2.5mM→0.2mM	1.6μl x □
Takara Tag	5U/uL → 1.5U/uL	0.3μl x □
DNA		2μl
DDW		12.9μl x □

說明：□為樣本數+1

<第一次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
94°C	3m	1cyc
94°C	30 s	35cyc
52°C	45 s	
72°C	60 s	
72°C	10 m	1cyc

<第二次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Takara Buffer	10x→1x	2μl x □
Primer M13	10μM→0.3μM	0.6μl x □
Primer M14	10μM→0.3μM	0.6μl x □
DNTP	2.5mM→0.2mM	1.6μl x □
Takara Tag	5U/uL → 1.5U/uL	0.3μl x □
DNA		2μl
DDW		12.9μl x □

說明：□為樣本數+1





<第二次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
94°C	3m	1cyc
94°C	30 s	35cyc
65°C	45 s	
72°C	60 s	
72°C	10 m	1cyc





4. 疱疹病毒(Herpessvirus)抗原檢測 PCR 之條件

疱疹病毒檢測方式為應用 Nested PCR 方式

<第一次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Thermos hotstar 2X PCR Master mix Buffer	2x→1x	10 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer DFA	10 μ M→0.2 μ M	0.4 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer ILK	10 μ M→0.2 μ M	0.4 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer KG1	10 μ M→0.2 μ M	0.4 μ l x <input type="checkbox"/>
DNA		2 μ l
DDW		6.8 μ l x <input type="checkbox"/>

說明：為樣本數+1

<第一次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
95 $^{\circ}$ C	10m	1cyc
94 $^{\circ}$ C	30 s	35cyc
47 $^{\circ}$ C	60 s	
72 $^{\circ}$ C	60 s	
72 $^{\circ}$ C	7 m	1cyc

<第二次 PCR 藥劑條件>:

藥物名稱	稀釋倍率	所需總量
Thermos hotstar 2X PCR Master mix Buffer	2x→1x	25 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer TGV	10 μ M→0.2 μ M	1 μ l x <input type="checkbox"/>
Primer IYG	10 μ M→0.2 μ M	1 μ l x <input type="checkbox"/>
DNA		5 μ l
DDW		18 μ l x <input type="checkbox"/>

說明：為樣本數+1





<第二次 PCR 時間條件>:

溫度	時間	循環數
95°C	10m	1cyc
94°C	30 s	35cyc
47°C	60 s	
72°C	60 s	
72°C	7 m	1cyc

