

出國報告（出國類別：實習）

赴日本北海道大學研習家禽流行性感冒野鳥跨國監測網絡、高病原性(HPAI)病毒特性分析及進行研究現況交流

服務機關： 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱： 陳麗璇 助理研究員

李婉甄 助理研究員

派赴國家： 日本

出國期間： 103 年 8 月 1 日至 103 年 8 月 18 日

報告日期： 103 年 11 月 16 日

摘要

本次赴日本北海道執行103年「候鳥遷徙途徑與家禽流行性感冒風險預警之國際交流及新浮現傳染病區域聯防機制之建立」計畫，日本北海道大學獸醫學研究所微生物學研究室為禽流感參考實驗室通過世界動物衛生組織（OIE）認可，家禽流行性感冒（禽流感）診斷及研究經驗豐富，且密切關注亞洲地區禽流感的病毒活動情形，有關蒙古、越南、西伯利亞等地區的病毒活動範圍也都略有涉獵，而2014年4月日本熊本縣爆發H5N8高病原性禽流感，而在稍早時間2014年韓國於1月及4月皆爆發H5亞型禽流感，因此不排除感染熊本縣雞場的病毒藉由野鳥傳播的可能。本次連絡北海道大學迫田義博教授得知對方已針對2014年熊本縣病毒進行一系列相關研究，其中還包括對於烏鴉的攻毒試驗，並同意本所研究人員共同參與。另外討論野鳥禽流感資料分析，學習改良式神經氨酸酶抑制試驗（NI test），並評估應用於家禽場血清監測之可行性亦是本次重點。日方分享正在進行的台日及鄰近國家H5亞型高病原性禽流感病毒的病原性及親緣性分析，其中告知於越南H5活躍的禽流感病毒與2014年熊本縣爆發H5N8病毒的病原性已與我國現有使用的H5抗體在病原性上有很大的差異，如使用我們現有的H5抗血清可能會無法及時鑑定這些病毒，日方亦表示可提供應急之抗體甚至我方相關單位許可的話可直接提供病毒，以供監測需要。

迫田義博教授詳細介紹於禽流感實驗室的生物安全第3等級動物實驗室（Animal Biosafety Level 3, ABSL3），包括設備的配置以及使用流程和取代淋浴設備的應變作法，並拜訪由前教授喜田宏（Hiroshi Kida）先生規畫及擔任負責人的北海道大學人畜共通疾病控制研究中心，參觀該中心生物安全第3等級實驗室（Biosafety Level 3, BSL3），並與喜田宏教授討論台灣目前禽流感問題及對防疫的建議。

目錄

一、	過程.....	3
二、	目的.....	5
三、	研習及參訪機構介紹.....	6
四、	研習內容.....	7
五、	研習期間觀察與心得.....	29
六、	建議事項.....	32
七、	附件.....	34
	附件一、北海道大學 2014 年野鳥與家禽場之家禽流行性感 監測概況.....	35

一、 過程

研習課程表：

日期	研習單位及內容
8月1日 (五)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 桃園中正國際機場搭機飛往日本北海道札幌市 (Sapporo, Hokkaido) 新千歲 (New Chitose Airport) 國際機場。 ➤ 烏鴉接種病毒試驗，接種 ➤ 研究人員及學生進行自我介紹
8月2日(六)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第一天
8月3日(日)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第二天
8月4日 (一)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第三天 ➤ 犧牲部份試驗烏鴉及處理採樣檢體 ➤ 雞胚胎接種
8月5日 (二)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第四天 ➤ 雞胚胎接種觀察，接種後第一天 ➤ 微生物實驗室學生學術交流 ➤ 岡松副教授介紹微生物實驗室之家禽流行性感冒研究歷史與發展
8月6日 (三)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第五天 ➤ 雞胚胎接種觀察，接種第二天 ➤ OIE Ring-trial 經驗交流 ➤ 與迫田教授和岡松副教授學術交流，討論台日家禽流行感冒合作研究之進展及目前之成果，及未來研究方向。
8月7日 (四)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第六天 ➤ 雞胚胎接種觀察，接種第三天 <ul style="list-style-type: none"> ■ HA test ■ HI test

	<p>■ NI test (第一天)</p>
8月8日 (五)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第七天 ➤ NI test (第二天) 結果判讀 ➤ Pestivirus 研究介紹，大六學生學術交流 ➤ 介紹目前微生物實驗室家禽流行感冒病毒 H10 亞型
8月9日(六)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第八天
8月10日(日)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第九天
8月11日 (一)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第十天 ➤ 拜訪喜田宏教授及參觀人畜共通疾病中心
8月12日 (二)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第十一天 ➤ Transport medium 製備
8月13日 (三)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第十二天 ➤ 大野池採集野鳥糞便檢體
8月14日 (四)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗觀察，接種後第十三天 ➤ OIE Ring-trial 檢測方法討論 ➤ 介紹家禽流行感冒病毒資料庫及其維護與管理
8月15日(五)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 烏鴉接種病毒試驗結束，犧牲動物與血清採樣 ➤ 訪客專題演講: 業務介紹
8月16日(六)	北海道野外實地考察
8月17日(日)	北海道野外實地考察
8月18日 (一)	札幌新千歲國際機場搭機返國，晚上7點抵達桃園國際機場

二、 目的

聯繫北海道大學微生物實驗室預計於 8 月進行台灣分讓的高病原性禽流感病毒株以及 2014 年於熊本縣爆發 H5N8 高病原性禽流感烏鴉攻毒試驗。另外目前本所於檢測病毒 NA 亞型時使用的神經氨酸酶抑制試驗，因操作過程繁複，希望能學習改良式神經氨酸酶抑制試驗，並評估應用於家禽場血清監測之可行性。而北海道大學對於野鳥禽流感的研究，因其病毒資料庫豐富且每年皆派研究人員至各國採樣以分離野鳥及家禽禽流感病毒，並進行各項研究包含疫苗的開發，從檢體收集至完整檢驗流程及病毒分離率的分析，皆是我們參考學習對象。另了解精簡化的 ABSL 3 實驗室，包括設備的配置以及使用流程和取代淋浴設備的應變作法。交流台日及鄰近國家 H5 亞型高病原性禽流感病毒的病原性及親緣性分析結果，評估未來可能面臨的爆發風險。

三、 研習及參訪機構介紹

北海道大學獸醫學研究所(Graduate school of veterinary medicine) 疾病控制學系的微生物學研究室，由已退休前教授喜田宏 (Hiroshi Kida) 先生建立的禽流感實驗室，現任負責人則為教授迫田義博 (Yoshihiro Sakoda) 先生，另外准教授岡松正敏 (Masatoshi Okamatsu) 先生為試驗室家禽流行性感冒相關研究的負責人，對於本次研習提供相當大的協助。

該實驗室為 OIE 認可禽流感參考實驗室之一，在亞洲地區動物流感的相關研究具有相當高的地位，具備 BSL3 實驗室及 ABSL3 實驗動物舍以供 OIE 及國家禽病指定實驗室所需，獸醫學系學生修業需 6 年，不論未來方向為臨床或實驗室，第 5 年級開始必須進實驗室為畢業前所需論文準備，而密集的實驗排程與計劃的除對學生有扎實的訓練外，對於實驗室而言亦有相當高的學術資料產出，本次拜訪 2 週的行程即參與了實驗室數次的專題討論，討論項目明確精簡卻可讓師生雙方明確掌握目的與現況。另外微生物學研究室與人畜共通疾病中心也有非常密切的合作。

北海道大學人畜共通疾病中心由喜田宏先生統籌規畫並為現任負責人，於 2005 年成立，該建築規畫為一樓全為 BSL3 實驗室及 ABSL 2 和 ABSL 3 實驗動物舍，並作為世界衛生組織(WHO)人畜共通疾病的合作中心，有相當多的國際學生參與其研究並可獲得學位，也經常不定期舉行訓練課程供國內外人員學習。

四、 研習內容

(一) 高病原性家禽流行性感冒鳥鴉攻毒試驗

生物安全第三等級動物實驗室 (ABSL 3) 背景：

獸醫學系大樓的五樓於 20 年前改建為 ABSL 3 實驗室，分成 A、B 與 C 三間，A 與 B 動物實驗室以小鼠試驗為主，設備狀況均可於實驗室外的監控設備獲得當日的數據，並於進入動物實驗室前填寫於紀錄本。

C 動物實驗室則為家禽流行感冒病毒進行病原性鑑定最重要的地點。現有 23 個隔離籠，以穿牆式滅菌器每次可進行 2 個隔離籠的高壓滅菌，每次 1.5~2 小時，全數隔離籠處理需費時一天以上，依該實驗室裡三個大籠架，每籠架可承受 9 個隔離籠，最多一次可放置 27 個隔離籠。

進出 ABSL 3 動物實驗室步驟：

1. 進入：
 - (1) 穿戴新隔離衣及手套後，於手腕上貼膠帶將手套固定於隔離衣。
 - (2) 穿戴舊隔離衣及手套，再一次於手腕上以膠帶固定手套與隔離衣。
 - (3) 依序穿戴好口罩、襪套及護目眼鏡進入緩衝區（具密碼鎖）
 - (4) 於緩衝區內穿拖鞋及鞋套，才能進入內門。
 - (5) 進入動物實驗室後，先將滅菌器裡的物品放置於緩衝區，或是處理乾淨與已滅菌事物。收拾上次脫下的隔離衣與襪套，分別以滅菌袋裝好，進行高壓滅菌，以便下次進入實驗室再回收使用；而使用過手套、膠帶、鞋套則棄置。

2. 離開：

- (1) 脫去第一層手套、隔離衣、鞋套、襪套及第二層手套的膠帶（不脫手套），並盡可能站在第一層隔離衣的內面上。
- (2) 將地上一塊毛巾以 Astop 消毒液浸溼，拖鞋放置其上，護目眼鏡置於消毒液中，待脫去第一層隔離衣完成後，才穿上拖鞋，以內層手套開門，進入緩衝區。
- (3) 在內門尚未關上的同時，把口罩、手套丟進實驗室內的地板上，最後於緩衝區內脫下內層隔離衣，亦丟回實驗室內的地板上，拿出消毒液中的護目眼鏡，才能帶著乾淨、已滅菌之事物（例如上次已滅菌之廢棄物或隔離衣）或檢體離開三級動物實驗室。
- (4) 離開三級動物實驗室時，必定要先洗手與優碘漱口，才進行其他事物處理（例如回收之隔離衣晾乾、襪套再以洗衣機洗淨或檢體處理等）。



進入 BSL3 實驗動物舍前穿妥兩層防護衣物。



兩層手套及封住袖口。



不得滅菌之病毒或可能汙染物以傳遞桶攜帶。



本次試驗之野生烏鴉。



點鼻方式攻毒烏鴉。

日期 (Date)	時間 (Time)	操作員 (Operator)	安全櫃+工作桌 (Safety cabinet)			消毒 (Disinfectant)	消毒 (Disinfectant)	消毒 (Disinfectant)	消毒 (Disinfectant)	消毒 (Disinfectant)
			開	閉	檢查					
2016.12.16	19:26-19:46	Y	CPV	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12.16	19:42-	Y	CPV							
			EV / CPV							
			EV / CPV							
			EV / CPV							
			EV / CPV							

每次進出紀錄試驗室設備狀況。

試驗背景：

這次高病原性家禽流行性感冒病毒熊本株及台灣的雲林株所攻毒的試驗對象為烏鴉，由於烏鴉數量在日本相當多，並且頻繁地出現或生活在城市中，於2004年爆發高病原性H5N1時，曾在死亡烏鴉身上檢測出病毒。

這次試驗用的烏鴉於夕張捕獲，並經篩選為年幼的烏鴉，由口腔中仍有紅色黏膜可知其尚為未成年的烏鴉，試驗期間可以餵飼狗食，另需剪羽翅減低其活動力，並因烏鴉本質上聰明、活潑且精力旺盛給予狗骨頭供轉移注意力，以避免烏鴉持續破壞籠子，雖是如此嚴防，但仍有烏鴉不停啄籠門旁的橡膠，至使隔離籠的氣密性有受損的可能。雖目前為止尚未注烏鴉成功

破壞氣密功能，但已有烏鴉成功地破壞進氣口之鐵網與過濾網。烏鴉常見兩種大嘴及小嘴，其食性略有不同，由於此試驗所使用之大嘴烏鴉較為雜食性，故可以狗食餵飼。

試驗使用毒株：

A/CK/TW/0502/12 (H5N2) 10^6 EID₅₀/100/L 接種 1~4 號烏鴉 (另尋時間補做剩餘 4 隻)

A/CK/Kumamoto/1-7/14 (H5N8) 10^6 EID₅₀/100/L 接種 5~12 號烏鴉

1. 接種流程：

- (1) 12 隻烏鴉均已置於 12 個隔離籠內。
- (2) 事先需先備妥三個以上酒精噴壺、飲用水、狗食及足夠的不銹鋼碗 (每籠準備 2 個碗)，生物安全操作櫃中便需放置 2 個酒精噴壺、足夠的 Astop 消毒液浸溼紙毛巾及滅菌袋。
- (3) 每個隔離籠取下，出氣孔接管處先以酒精噴之，脫開接管處亦噴之，將整個隔離籠置於生物安全操作櫃中。
- (4) 接種病毒時，需兩人共同操作，一人持病毒液，另一人手戴厚手套抓住禽鳥之喙與雙腳，以固定禽鳥方便進行鼻腔接種以及抽血。
- (5) 隔離籠另需以 Astop 消毒液浸溼之紙毛巾清潔玻璃籠門以及氣密橡膠 (需手戴厚手套)，換置水與食物之後，使用過的不銹鋼碗及紙毛巾置於滅菌袋中，換置過程中慎防烏鴉逃脫。
- (6) 關上隔離籠，需於隔離籠四周及自己的雙手手肘均勻地噴灑酒精 (可雙手均持酒精噴壺互相噴之，以避免死角)，再提至籠架上接上出氣管。

試驗動物隔離籠配置表

#1 TW	#5 JP	#6 JP
#2 TW	#3 TW	#4 TW

#7 JP	#8 JP	#9 JP
# 10 JP	#11 JP	#12 JP


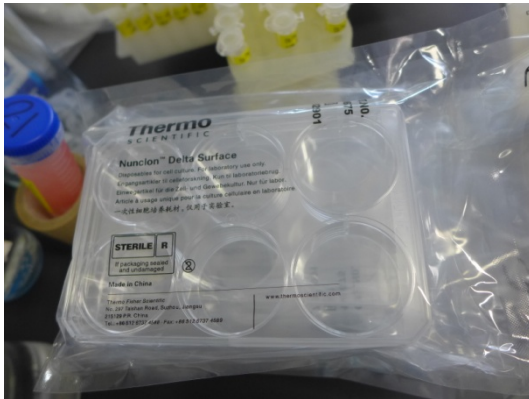
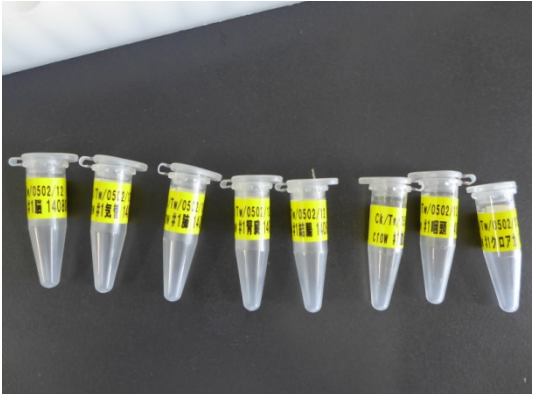
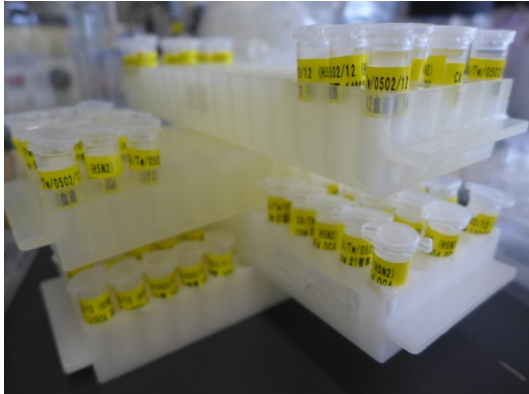
各動物試驗時程

動物編號	於接種後 3 天 犧牲採樣	持續觀察至接 種後 14 天	試驗期間死亡
#1 TW	●		
#2 TW	●		
#3 TW	●		
#4 TW	●		
#5 JP		●	
#6 JP		●	●(6DPI)
#7 JP		●	
#8 JP		●	●(8DPI)
#9 JP	●		
#10 JP	●		
#11 JP	●		●(3DPI)
#12 JP	●		

2. 接種後 3 天犧牲採樣：

- (1) 前置處理：準備採樣所需剪刀、鑷子、六孔盤、3 mL 採血針（內含 0.5 mL citriacid）筒、拭子、檢體保存液(transport medium)、傳遞箱、標記有毒株、臟器與鳥隻編號的微量離心管（eppendorf tubes），及犧牲動物用的 pentobarbital (1mL/bird)。
- (2) 犧牲與採樣皆於生物安全櫃內操作，每毒株犧牲 4 隻烏鴉。

- (3) 待犧牲烏鴉每隻採血 1 mL，隨後以 pentobarbital 安樂死。
- (4) 採咽喉與瀉殖腔拭子並存於檢體保存液。
- (5) 每次只操作一隻，每採完一臟器後，器械以 Astop 消毒液擦拭後浸泡於 80% 酒精再採下一臟器。
- (6) 採樣臟器：腦、氣管、肺、腎、結腸。各別置於 6 孔排不同格內，並標記六孔盤。

	
<p>準備採樣器械。</p>	<p>準備六孔盤盛裝採下臟器。</p>
	
<p>事先標記好採樣管。</p>	<p>當日犧牲採樣所需管數。</p>

3. 製做臟器乳劑：

- (1) 秤重 0.2 g 臟器並置於均質機 (Multi-bead shocker) 專用管中，以鑷子夾取鋼球，一同置於均質管中，以均質機啟動 2000 rpm 持續 15 秒。均質機使用前，需注意管子放置平衡。
- (2) 配上 1.8 mL 檢體保存液以配置為 10% 乳劑，再次以均質機啟動 2000 rpm 持續 15 秒。

- (3) 乳劑倒入 2 mL 微量離心管，以 8000 rpm 離心 5 分鐘。
 - (4) 取上清液 1.5 mL 分裝至 3 管已標示微量離心管保存，每管含 0.5 mL。
4. 血液、咽喉與瀉殖腔拭子處理：
- (1) 每管血液混勻後分裝至 3 管已標示微量離心管保存，每管含 0.5 mL。
 - (2) 拭子以 3000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液分裝至 3 管已標示微量離心管保存，每管含 0.5 mL。
 - (3) 所有含檢體之微量離心管在進行下一步細胞接種前，均需置於 -80°C 冰箱保存，每次進行一項檢測便取一管使用。

(二) 雞胚胎蛋接種試驗

試驗背景：

本次研習目的之一為學習改良版的神經胺酶抑制試驗，因傳統的神經胺酶抑制試驗操作過程中需要使用相當多的玻璃試管，且步驟需煮沸加熱，對於操作上相當的不便且有潛在的危險，迫田教授表示他們實驗室目前常規操作的為改良版且不使用玻璃管操作，也較可同時進行多樣檢體的測定。需先以雞胚胎蛋進行病毒增殖，以供應後續血球凝集、血球凝集抑制及神經胺酶抑制試驗所需檢體來源。


選用病毒株：

4#: A/duck/Hokkaido/960/1980 (H6N2)

7#: A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1)

1. 雞胚胎接種

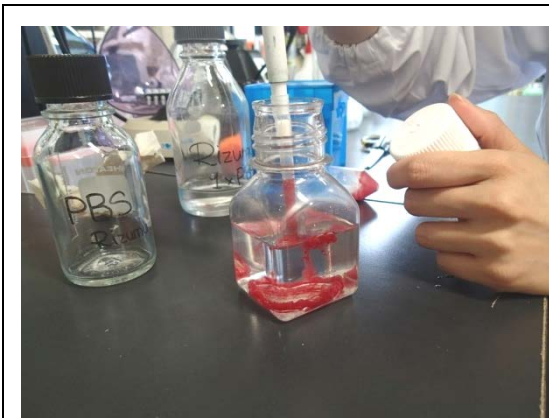
- (1) 選用 9-11 天的雞胚胎蛋，照蛋劃出接種尿囊腔的位置，接種時避開血管。
- (2) 接種前用尖錐尿囊腔上緣打洞，接種後用樹脂封口。
- (3) 每毒株各接種 4 顆蛋，以 1ml 針筒注射每顆每顆蛋 100 μ L。
- (4) 蛋標記後置培養箱 35°C 培養 2 天，並每日觀察。
- (5) 將蛋置 4°C 冰箱一天後收集尿囊液。

	
接種後標記並封住洞口。	收集尿囊液。

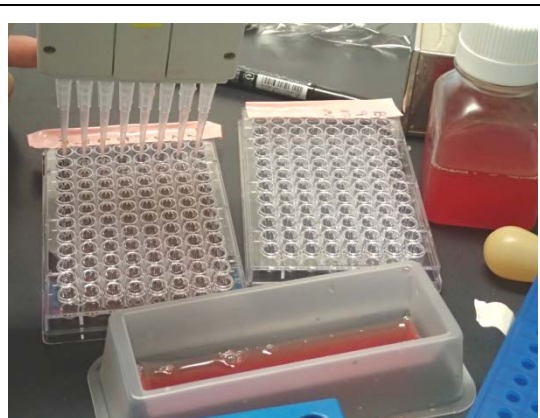
(三) 血球凝集試驗 (Hemagglutination test; HA test)

利用禽流行性感冒病毒表面血球凝集蛋白 (hemagglutinin) 可與雞紅血球可產生凝集現象，於本次試驗的目的為先確認尿囊液中是否含有具血球凝集能力之病毒，以進行後續試驗。

- (1) 以 96 孔微量測定盤進行試驗。
- (2) 每孔各加入 50 μ L PBS。
- (3) 第 1 孔 (A1~G1) 分別加 50 μ L 尿囊液。陰性對照：H 列的第 1 不加抗原液。
- (4) 由第 1 孔開始進行 50 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 50 μ L。
- (5) 全盤每孔加 50 μ L 之 0.5% 雞紅血球懸浮液，貼上膠帶加以標示。
- (6) 輕拍盤子使混合均勻，在室溫中放置約 30 分鐘。血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀。
- (7) 記錄 HA 力價。



配置 0.5% 雞紅血球。



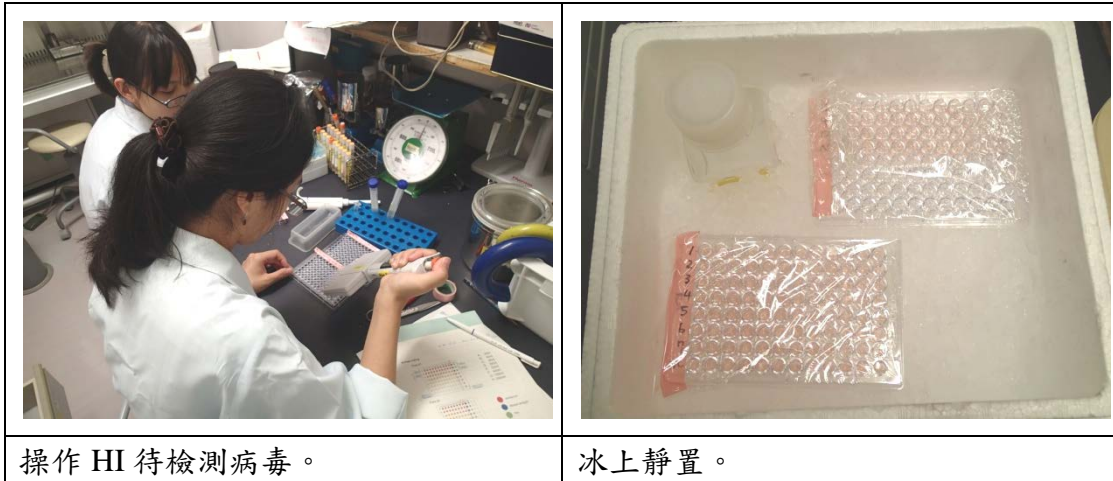
各孔加入 50 μ L 之 0.5% 雞紅血球。

(四) 血球凝集抑制試驗 (Hemagglutination inhibition test; HI test)

原理為利用已知的抗血清中的血球凝集蛋白抗體與病毒的血球凝集蛋白產生中和作用，使病毒沒有多餘的血球凝集蛋白可以使紅血球凝集，依此原理可鑑定未知病毒/抗原之 HA 亞型，亦乃為現今微生物研究所重要且基本的禽流感病毒鑑定法。而 HA 抗血清製備時需使用所有不同亞型的已知病毒株，如 H1-H16 等，因新城病也同樣具有血球凝集能力，因此也會於 HI 試驗中，同時使用新城病抗血清用來區分未知病毒是否為造成 HA 試驗中血球凝集的原因。進行 HI test 之前會先將未知病毒/抗原力價調整為 8 HAU (即需在 HA test 時得到血液凝集力價為 8 倍)。

- (1) 製備 HI 試驗用未知病毒/抗原稀釋液及迴歸力價測定：
計算進行 HI test 待測定檢體總體積後，將已知 HA 力價未知病毒/抗原液以 PBS 稀釋為 8 HAU / 50 μ L 濃度。
- (2) 分裝 25 μ L PBS 至各列的第 1~10 孔 (11 與 12 排除外)。
- (3) 分別加 25 μ L 各亞型及 ND 標準抗血清至 A 列各孔 (A11 與 A12 除外)。
- (4) 從 A 列至 H 列方向進行 25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一列各丟棄 25 μ L。
- (5) 除 11、12 排之外，每孔加入 25 μ L 8 HAU 試驗用未知病毒/抗原稀釋液。
- (6) 第 11 排供迴歸檢測 (Back titration)，第 11 排每孔加 50 μ L PBS，第一孔加入 50 μ L 試驗用之未知病毒/抗原稀釋液，由第 1 孔開始進行 50 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 50 μ L。

- (7) 第 12 排為陰性對照，每孔加入 50 μ L PBS。
- (8) 貼上膠帶，室溫感作 30 分。
- (9) 加入 50 μ L 0.5%之雞紅血球懸浮液，輕微振盪混勻後，靜置室溫 15 ~ 20 分鐘（若病毒分離自野鴨糞便檢體則置冰上 30 ~ 60 分鐘）。
- (10) 當陰性對照之血球完全沉降即可判讀，可完全抑制 8 HAU 病毒/抗原的血清最高稀釋倍數即為該標準抗血清之 HI 力價，亦即該標準抗血清具完全拮抗 8 HAU 未知病毒/抗原之能力。紀錄何者標準抗血清具多少 HI 力價。



(五) 神經胺酶抑制試驗(Neuraminidase assay, simplified)

利用病毒表面神經胺酶活性可切割 Fetulin 產生 sialic acid，將 sialic acid 經化學處理後在最後可於溶液呈現透明或粉紅色，而依顏色判定 sialic acid 的存在與否而依此推測病毒是否存在或 NA 活性有效。而若有已備製之禽流感常見之 N1~N9 抗血清，則可進行神經胺酶抑制試驗，鑑定禽流感之 NA 亞型。

材料：

- (1) 0.2M Phosphate buffer (pH5.9)

混合 0.4M Na_2HPO_4 19 mL 及 0.4M NaH_2PO_4 81 mL，
並調整 pH 值到 5.9。

(2) Fetuin substrate

10 mL SDW 中加入 500 mg fetuin，再加入 10 mL 0.2M
Phosphate buffer。

(3) Periodate reagent (需避光)

38 mL SDW 中加入 4.28g NaIO_4 ，再加入 62 mL 磷酸
(H_3PO_4)。

(4) Arsenite reagent

100 mL SDW 中加入 10 g NaAsO_2 及 7.1 g Na_2SO_4 。
最後加入 0.3 mL 濃硫酸。*配製時請停止風扇運轉，
並戴口罩與手套。另外此試劑含砷，勿倒入水槽。

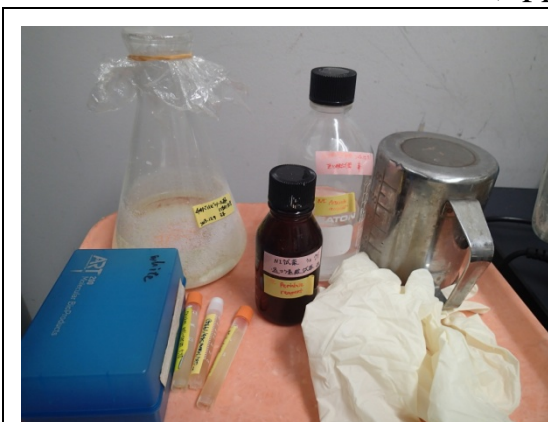
(5) Thiobarbituric acid reagent (TBA)

200 mL SDW 中加入 1.2 g Thiobarbituric acid 及 14.2 g
 Na_2SO_4 ，並加熱至溶解。

(6) 10 倍稀釋標準血清 N1-N9, NDV,S1 (Swine H1N1) 共
11 種

(7) 滅菌 PBS

(8) 微量離心管 (Eppendorf tubes, 25 tubes for 1 sample)



NI test 所需材料，注意需避光藥劑與有毒的砷劑。



Thiobarbituric acid 有沉澱屬正常現象，使用時避開沉澱物即可。

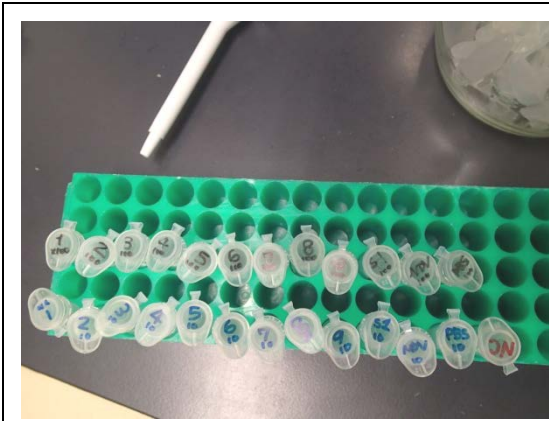
步驟：

- (1) 將待測病毒液分別以 PBS 稀釋 10 倍與 100 倍。
- (2) 標記微量離心管對應的病毒稀釋倍數以及抗血清。

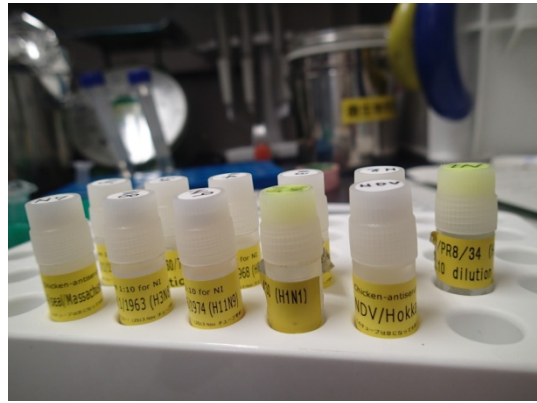
病毒稀釋液與 10 倍稀釋抗血清配置表

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	SN1	NDV	PBS
10 倍	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
100 倍	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

- (3) 於微量離心管加入 10 μ L 待測病毒液以及 10 μ L 標準血清 (共 22 管)。
- (4) 取 1 微量離心管不加病毒液與血清，並各以同體積 PBS 取代，為陰性對照。
- (5) 2 微量離心管各加入不同稀釋倍數病毒液各 10 μ L，但不加標準血清並以同體積 PBS 取代，為陽性對照。
- (6) 靜置室溫作用 1 小時
- (7) 各管加入 20 μ L Fetuin substrate solution，混合均勻後 spin down，管子均密封(可用 parafilm®纏繞)，靜置 37 $^{\circ}$ C 至隔夜。
- (8) 第二天各管加入 20 μ L Periodate reagent，靜置室溫作用 20 分鐘。
- (9) 加入 200 μ L Arsenite reagent 終止反應，利用振盪器混勻至褐色消失。
- (10) 加入 500 μ L TBA 並混勻，置於 80 $^{\circ}$ C 以上熱水浴 15 分鐘直至溶液顏色變粉紅。
- (11) 因抗血清完全拮抗病毒之 NA 活性則顏色會轉為透明，仍有 NA 活性為粉紅色，活性較弱則為淡粉紅。



準備與標示所需微量離心管。



已 10 倍稀釋 NI test 標準血清。



置於 80°C 以上熱水浴 15 分鐘。



80°C 以上熱水浴 15 分鐘後溶液變粉紅色。

注意事項：

試驗後反應液體因含砷劑為毒性物質，需另外倒出回收，裝過的容器也要另外處理。



處理含砷劑廢液。

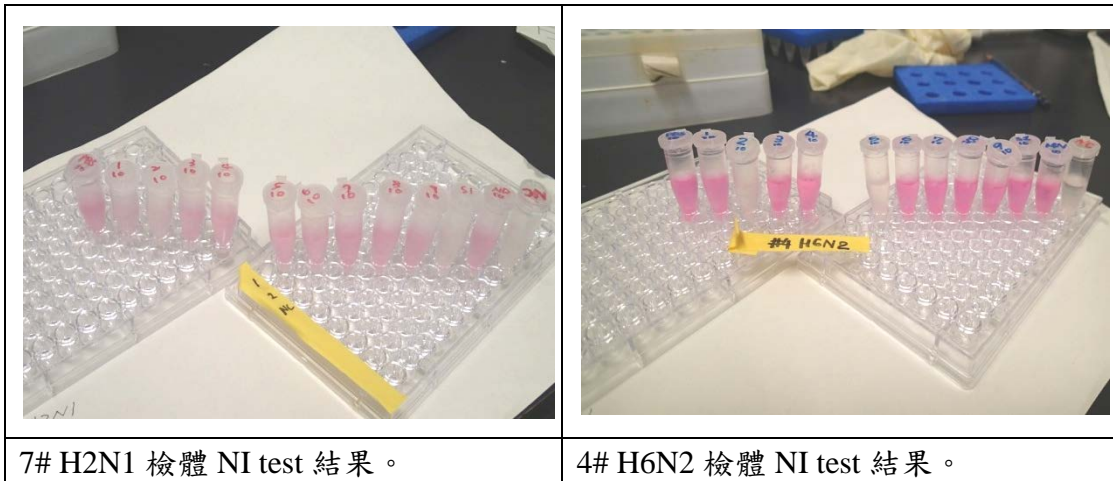


接觸過砷劑物品需封口後才丟棄。

結果：

NI test 會有如同 HI test 有 HA 與 NA 兩者交互影響的情況，而使檢測結果果可能會有兩種以上的 NI 反應，有必要的話必須檢視標準血清並對照 HI 結果重新找其他病毒株的 NA 標準血清重作。以本次進行病毒亞型鑑定之 H2N1 為例，原理上應被 N1 之標準抗血清所拮抗，因而與 N1 抗體作用而無法呈現 NA 活性，反應液呈現透明色，因此 N1 與 SN1 反應管均呈現透明色。但卻出現 N2 反應管同樣呈現透明色，原因為該 N2 抗血清備製時所使用之病毒為 H2N2，因 HA 與 NA 俱為病毒表面蛋白，若 HA 的抗原抗體複合物過大過多而可能干擾或遮蔽 NA 活性呈現。遇到此類情形，另需選用相同 NA 亞型但不同 HA 亞型之抗血清、利用吸光度檢測 NA 力價或進行序列分析。

本次試驗操作目的為判定未知病毒的 NA 亞型，而在本所預計將應用為偵測血清中的抗體種類，雖然原理相同，但若血清中帶有兩種以上病毒抗體時會難以區別 NA 亞型。



(六) Transport medium 檢體保存液配製

此保存液除了適用於野鳥採集之糞材之外，亦適用於拭子或試驗動物之臟器。同時可做為 MDCK 細胞株之培養液。

材料：

MEM 粉末

Penicillin G potassium (1,000,000 units)

Streptomycin (1 g)

Gentamicin sulfate (1 mL)

Nystatin (為預防黴菌之藥物，原始形態為粉末，以 0.2 g 與 SDW 4mL 及 96 mL PBS 混合備用)

Bovine Serum Albumin Fraction V (Roche,#10735086001-100 g)

10% NaHCO₃ (及粉末狀藥品)

超純水

步驟：

(1) 1.88 g 的 MEM 粉末溶於 150 mL 的超純水中。

(2) 加入下列藥品：(無法以滅菌器進行滅菌者)

Penicillin G potassium：2 瓶 (最終濃度為 10,000U/mL)

Streptomycin：2 瓶 (最終濃度為 10 mg/mL)

Gentamicin sulfate：1 瓶 (最終濃度為 0.3 mg/mL)

Bovine Serum Albumin Fraction V：1 g(最終濃度為 0.5%)

Nystatin：5 mL

利用 10% NaHCO₃ 調整 pH 值到 7.5。(一開始可使用 NaHCO₃ 粉末調整，待顏色開始變化，再使用 10% NaHCO₃ 進行微調)

用量筒將總量以超純水加到 200 mL。

(3) 利用特殊過濾玻璃套組裝置，接上真空幫浦，以通過 0.45 μ m 過濾膜的方式達到無菌的效果。

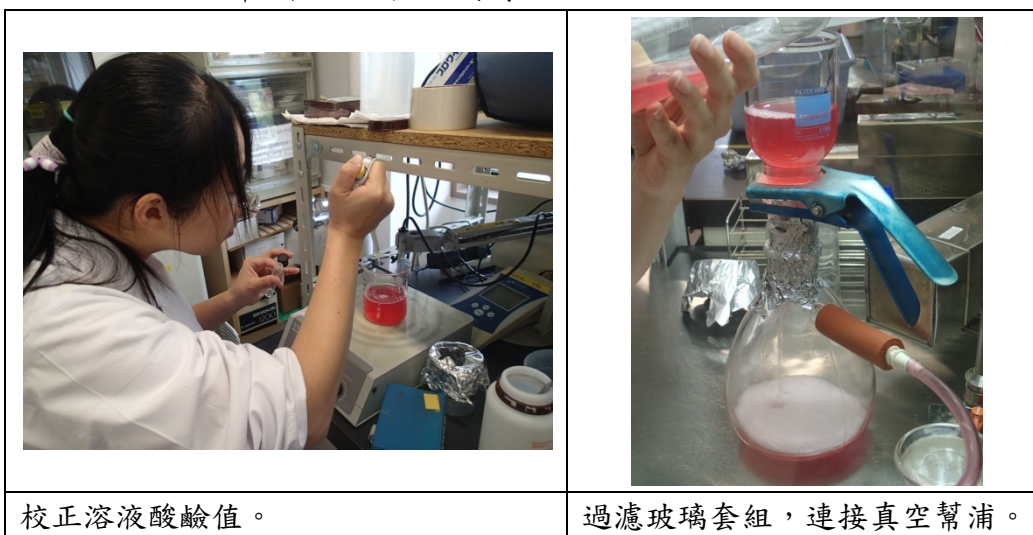
注意事項：

(1) 由於 Bovine Serum Albumin Fraction V 遇水會變黏，因此配製檢體保存液時，需選用廣口瓶，利於粉末加入而不致於

吸附瓶壁上。

(2) Nystatin 粉末會留滯於最後步驟的過濾膜上，因此若有液態的 Nystatin 可選用較佳。

(3) 試驗過程中另需備有 pH 校正儀、已滅菌之過濾裝置、真空幫浦及純水設備等。



野鳥檢體採樣及處理

1. 糞便採集

需攜帶的材料：

保溫箱、碎冰、5 mL 小採樣管、採樣木片、夾鍊袋、酒精棉、手套、垃圾袋。

採樣時間地點：

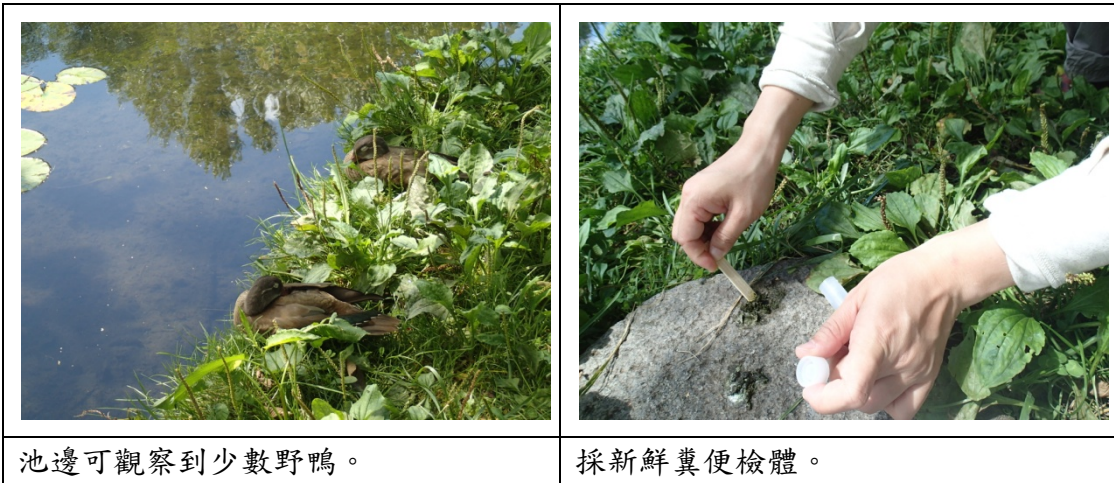
大野池位於北海道大學校園內，為學校內重要地標之一，每年的 9 月到 11 月，為野鳥暫時的棲地，因 11 月以後大野池面會結凍，野鳥會全數離開。也因此每年微生物實驗室會在 9 月到 11 月間，對大野池及北方一處名為稚內的野鳥棲地進行野鳥家禽流行性感冒病毒之監測。當接近秋冬時，糞便於枯草或薄薄的雪地上，會比較明顯容易尋找，實驗室人員在採樣前會先進行觀察，該區域活動的禽鳥種類，再上前採集較為新鮮的糞材。

過程：

本次於大野池岸邊草叢間找尋新鮮野鴨糞便，挖取少量至於小採樣管內密封後置於碎冰帶回實驗室處理。研習期間時值夏末秋初，雖有數隻鴨子徘徊，但大野池四周仍呈現綠草如茵的景色，因此黃棕帶綠的野鴨糞便在草地上並不明顯(白色的尿酸含量亦較少)，再加上有時尿酸含量較多的烏鴉糞便，常會影響判別，因此本次僅採到兩件檢體。

2. 野鳥糞便處理

- (1) 將 transport medium 加入含有野鳥糞便檢體試管中，混合均勻。
- (2) 於 4°C 下以轉速 2,000 rpm 離心 5 分鐘。
- (3) 取 0.5ml 上清液進行雞胚胎蛋接種。



(七) 拜訪喜田宏教授及參觀人畜共通疾病中心

本次在迫田教授介紹下得以有機會拜訪喜田宏教授，喜田教授與本所禽流感診斷實驗室有相當深厚的淵源，包括診斷及禽流感實驗的建立，以及檢測所需的標準毒株等都提供相當大的幫助，對於亞洲的禽流感歷史與現況也有相當深入的研究。目前喜田教授已於 2014 年 4 月自北海道大學獸醫學研究所退休，現任為人畜共通疾病中心最高管理人，喜田教授認為台灣家鴨的 H5 亞型病毒是必需重視的監測項目，且鴨科感染禽流感病毒往往不會有血球凝集抑制的抗體力價上升情形，因此檢體直接的進行分離或檢測是比較建議的作法。

拜訪喜田教授後，迫田教授介紹人畜共通疾病中心，該中心規畫一層樓作為生物安全等級 3 實驗室，以方便地下室相關管線連接，重型機具擺放以及實驗動物進出，中心的出入口設有門禁管制，且進出各實驗室均需以感應卡解鎖，依不同動物體型規畫有不同房舍及專用出入口，每間房舍有備有監視器與遠端電力控制開關，地下室則為空氣及水處理系統，另外於中心之外有大型供電系統以供斷電時維持所需，最高可維持約一天整棟中心的電力，因電力是維持負壓也就是生物安全的相當重要的一部分，因此備援電力被視為相當重要的一環。人畜共通疾病中心的面積很大，一樓設有許多第三等級動物實驗室、第三等級實驗室與第二等級動物實驗室，因此在閒置的時期，還可分區關閉（包括負壓維持系統）與分區消毒，以彈性使用及節省能源。

另外人畜共通疾病中心周邊也由喜田教授爭取計畫，以開始建設第二、三座人畜共通疾病中心，預計於 2015 年 4 月完工。對於三級實驗室的規畫，迫田教授認為一開始的規畫就決定了後續的使用與維護費用，若在經費充份的情形之下，依三級實驗室

的設備需求與規定進行建設是最好的選擇。因此在規劃之前必須審慎評估日後的需要、經費的來源、試驗室大小、主要實驗內容、管線配置廢水處理等相當多因素。



人畜共通疾病中心。



迫田教授介紹實驗室監控系統及管理人。



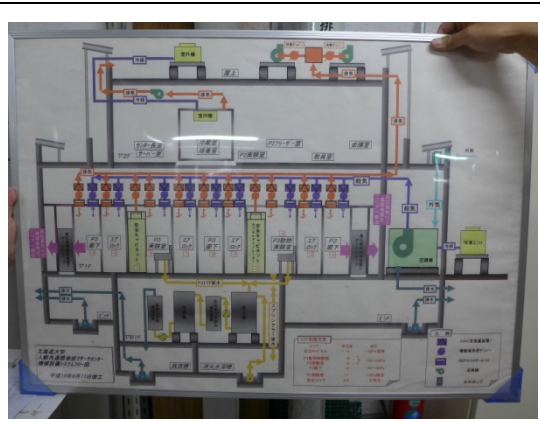
實驗室外耗材與準備區。



人畜共通疾病中心備源發電設備。



BSL3 動物實驗室。



地下室氣體液體處理管線與機具配置。



詳述實驗室廢水與氣體動線。



人畜共通疾病中心 1 樓實驗區試驗區與非試驗區示意圖。

(八) 病毒庫及禽流感線上資源利用

北海道大學建立線上病毒資料庫，內容蒐集有病毒株完整資料，包括時間、地點、動物別、病毒力價、亞型與及因序列等，並結合 google map 標示來源地點，另外還於病毒株保存庫實體建立連結，因此可於線上查詢庫存情形及儲存位置。而資料庫亦收藏相關研究論文著作，並可在病毒株資料附有論文連結以便搜尋。

線上資料庫並設有權限分級，由最高權限管理者決定資料開放程度，一班學生在校內可查詢約 80% 資料庫內容，而校外連線者可查詢約 50% 資料內容。病毒各段基因序列設有篩選功能，可以 HA, NA 亞型篩選並只列出所要找的片段基因。對於日後分析工作相當有利。

岡松準教授並介紹病毒保存庫的配置與管理，每一株病毒皆詳細建檔，並依常用和長期保存用分置於不同區域，以免病毒活溫度變動或反覆冷凍解凍而降低活性，然而線上系統僅供查閱，故當學生取用

病毒後線上的庫存數量並不會馬上隨之更動，而是每半年或一年需個別清點，工程相當浩大，偶爾也會發現有病毒株僅剩極少庫存的情況，仍是目前管理上較為不便的地方。

資料庫入口

資料分類為病毒庫與研究文獻

10	Details A/duck/Vietnam/OIE-2202/2012	5	1	2012	Yen Binh, North, Vietnam	Duck	Swab from cloacal tracheal	List PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS	List 2	HPAIV, IVPI in chickens=3.00
11	Details A/duck/Vietnam/OIE-2203/2012	5	1	2012	Yen Binh, North, Vietnam	Duck	Swab from cloacal tracheal		List 0	HPAIV
12	Details A/duck/Vietnam/OIE-2204/2012	5	1	2012	Yen Binh, North, Vietnam	Duck	Swab from cloacal tracheal		List 0	HPAIV
13	Details A/duck/Vietnam/OIE-2205/2012	5	1	2012	Yen Binh, North, Vietnam	Duck	Swab from cloacal tracheal		List 0	HPAIV
14	Details	5	1	2012	Yen Binh, North, Vietnam	Duck	Swab from cloacal		List	HPAIV

病毒資料庫以一般校外使用者可查詢的權限，部分病毒附有採樣地點 google map 標示，以及定序情況與動物試驗結果。

五、 研習期間觀察與心得

本次研習期間，迫田教授邀請我們參加為生物實驗室各次專題討論，演講者不論師生都以英文演說，教授表示他們很希望能以國際合作的部分訓練學生不會害怕或逃避使用英文。而學生除了在演說之外對於外國研習人員也會主動接觸與協助，且北海道大學微生物實驗室目前每年皆安排研究人員包括準教授或博士班學生至蒙古越南等地採樣。部分大學學生也會於暑期至與實驗室有合作的泰國或其他國家實驗室研習或進行研究。迫田教授也提到日本獸醫的修業所需時間為六年，畢業後的資格等同國內其他科系的碩士，學生在畢業之前必須完成畢業研究論文報告，因此在大五大六兩年就必須進入實驗室開始相關研究，不論未來工作是否決定以臨床或實驗室為主。

烏鴉試驗中主要負責人原為岡松正敏準教授，另外還有大五學生小笠原浩平參與。迫田教授與岡松準教授與我們分享目前幾株亞洲高病原性禽流感毒株，包含台灣 2012 年 H5N2 與 2014 年熊本縣等毒株的研究計劃、進度與成果，值得一提的是於抗原性分析的結果，以台灣分讓北海道大學的 A/ck/TW/0502/12、A/ck/TW/A703-1/08 毒株其抗原性差異與本次爆發於熊本縣的毒株差異相當大。而另外親緣性分析上熊本縣的 HA 基因序列落在 clade 2.3.4，因此推測以目前我們所使用的抗血清可能對於偵測 clade 2.3.4 甚至 clade 2.3.2 會較有困難，因這兩群毒株來源都在我們鄰近國家發生，需謹慎看待可以的話先備好足以應付緊急狀況的標準血清。而在資訊交流過程可發現，對於每一株重要病毒株，實驗室都會例行性且很有計畫的完成基礎的資料，包括動物試驗如雞隻靜脈內注射致死率試驗或點鼻試驗（雞、鴨、烏鴉）、基因定序，親緣性分析抗原性分析等，以作為後續研究的基礎資料。

關於野鳥監測的部份，北海道大學獸醫學研究所微生物實驗

室進行野鳥家禽流行性感感冒監測歷來已久，範圍遍布東亞及東南亞，包括俄羅斯西伯利亞(東區、西區及遠東區)、蒙古、中國青海、越南活禽市場、澳洲、美國阿拉斯加及日本北部。統計自1991至2013為止，一共採集49,320檢體，並成功分離1,285株家禽流行性感感冒病毒。雖然並非每年進行各國野鳥採樣，需依該年度是否獲取計劃經費支持而定，但仍成果豐碩。另外北海道大學對於野鳥採樣的部分也希望能達成收集到HA 16亞型與NA 9種亞型的所有組合，也就是144種病毒，以利相關的疫苗研究活動。在野鳥檢體的病毒高分離率也是我們感興趣的部分，岡松準教授表示，他們採集時間以秋天且以候鳥密集活動的地區為重點，例如每年9月在蒙古的Uvs lake周邊，一次前往採樣時間約3天，採集約2000支，回實驗室後馬上進行後續處理，通常都有相當豐富的收獲。

該實驗室收集之病毒亞型共計74種，另外以病毒重組及反向遺傳方式完成流行感冒病毒不同亞型之資料庫。並將所有病毒株背景資料、病原性、抗原性及庫存量以網頁網站方式供大眾查詢。

病毒資料庫的抗原特性分析另有特殊功能，尤其對疫苗種毒株的選擇很重要，疫苗種毒株除了選擇抗原性相近者，尚需考量該病毒株是否具高增殖性。目前為止，該實驗室已利用此病毒庫挑選野鳥分離株做為疫苗種毒株，能成功保護人的全球性H1N1，及2013年大陸發生的H7N9，以及家禽的H9與H6流行性感感冒病毒。

北海道大學負責北日本的野鳥禽流感監測計畫，在野鳥遷徙季節時是實驗室最忙碌的時候，一週可能要處理的野鳥檢體數量可達1000件，有相當多的學生及工作人員投入此部分研究，在本次操作雞胚胎接種過程中發現，對方使用的雞胚胎蛋即使接種野鳥糞便來源的檢體也不容易死亡，即使接種劑量高達0.5mL

時亦是如此，且相當羨慕的是因日本雞隻血清皆無禽流感病毒抗體，因此即使 SPF 雞蛋的生產來不及供應野鳥季節時所需，也有普通蛋雞場可供應，甚至一週供應一萬顆都不是問題，價錢也相當便宜，一顆價格約在 0.5 美金，日本要求養雞場必須為禽流感病毒血清抗體陰性，對於汰換 SPF 種雞以強化子代上也較為容易，可供應良好品質的試驗用動物。另外日本的家禽場禽流感主動監測的方式為家禽血清不得檢出抗體，一旦抗體陽性場就必須限制移動，每月採樣監測直到未檢出抗體 3 個月後才可解除移動管制，日本今年主動監測禽流感病毒與血清抗體部份至 8 月為止，均為陰性(見附件一)，這也是為什麼在本年熊本縣爆發疫情後日本可以在短時間內解除疫區狀態的成功原因。

六、 建議事項

本次研習中對於神經胺酶抑制試驗應用於監測血清的部分建議以研究為主，應用於田野間血清檢體上則較不建議，因台灣禽場田間影響變數太多，常致使無法判定。回到最根本的應以家禽血清抗體成為陰性為最終目標。

與喜田教授討論後，家鴨禽流感的部分也是必須小心的部分，以本次熊本縣發生的 H5N8 為例，該病毒與韓國爆發株相近，微生物實驗室接種鴨隻試驗，發現鴨隻都會存活，由於韓國爆發的是鴨隻，顯得難以發覺病毒存在，而日本發生於雞場，會造成雞隻死亡，比較容易查覺病毒的擴散與分布。因此對鴨隻的監測應提高警覺，然而台灣的鴨隻面臨的除了外來的 H5 病毒威脅，亦有台灣雞場以及台灣本土鴨隻特有的 H5N2，而鴨隻感染病毒後也無法以血球凝集抑制的抗體力價呈現，因此對鴨隻的主動監測應儘可能直接進行病毒分離或檢測。

今年與北海道大學獸醫學研究所微生物實驗室一同參與 OIE Ring Trial，研習期間進行家禽流行性感冒病毒的即時反轉錄聚合酶鏈反應(real-time RT-PCR, rRT-PCR)以及傳統反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)檢測方法的經驗交流。雙方均表示目前缺乏一套優質的 rRT-PCR 引子與探針可以完全檢測全世界的 H5 或 H7，H5 與 H7 基因分別需分 2 套引子與探針，以涵蓋歐亞群與美洲群的家禽流行性感冒病毒。而本次試驗檢體中有 1 株難以區別之 H7 基因，無法以現有參考實驗室推薦之 rRT-PCR 系統檢出，而微生物實驗室引進越南國家獸醫診斷中心一組引子與探針取代原歐亞群 H7 的 rRT-PCR，目前已可檢出所有 H7 基因。該組引子與探針，亦慷慨地與我方分享，而我方使用之傳統 RT-PCR 引子亦與日方共享。

對於野鳥檢體有相當高的分離率，除了在春秋於候鳥遷徙路

徑上的停留站加強採樣之外，採候鳥而非留鳥糞便、檢體新鮮程度與是否經曝曬過久等因素，對於檢體的保存，採集後盡快處理並馬上接種胚胎蛋，或許對於分離率有幫助。

儲備其他亞洲發生中高病原性病毒的標準血清甚至可能的話活病毒株對於監測也是相當重要的一環，因抗血清屬消耗性產品，建議以開放輸入活病毒以自行製造抗血清較為理想。且一般研究單位對於分讓重要病毒大多為保守態度，北海道願意如此大方分享相當難得。

本次前往北海道大學研習相當難得的是有關仍在進行中的資訊對方仍願意大方分享，且牽涉到台灣病毒株的部分是以合作的方式進行討論，由其提到家鴨病毒監測方式與病毒抗原分析的問題是我們必須特別留意的部分，迫田教授也希望未來雙方可以持續維持密切的合作，以強化養禽場的防疫以及相關的研究活動。

七、 附件

附件一、 北海道大學 2014 年野鳥與家禽場之家禽流行性感冒監測概況。

平成 26 年 8 月 12 日
環境省自然環境局鳥獣保護業務室

平成 25 - 26 年シーズンの野鳥における鳥インフルエンザウイルス保有状況
調査の結果について

H25-26 シーズン(平成 25 年 10 月から平成 26 年 5 月)は、表 1 に示すとおり、糞便及び死亡野鳥のウイルス保有状況調査において、高病原性鳥インフルエンザウイルス(HPAIV)は検出されなかった。なお、病原性の低い鳥インフルエンザウイルス (LPAIV*) は、定期糞便採取調査で 27 検体検出された(表 2)。また、図 1 に LPAIV の月別分離率を示す。表 3 には、死亡野鳥等調査で回収された死亡野鳥総数内訳を示した。

*家畜伝染病予防法で規定される低病原性鳥インフルエンザ及び鳥インフルエンザに準じて、低病原性鳥インフルエンザウイルス (H5 又は H7 亜型の A 型インフルエンザウイルスのうち、高病原性鳥インフルエンザウイルスと判定されたものを除く) 及び鳥インフルエンザウイルス (高病原性鳥インフルエンザウイルス及び低病原性鳥インフルエンザウイルス以外の A 型インフルエンザウイルス) を含む。

表 1 ウイルス保有状況調査総括表

調査年(平成)	21-22年 (10-9月)	22-23年 (10-9月)	23-24年 (10-9月)	24-25年 (10-9月)	25-26年 (10-5月)
検査総数	13,879	13,943	13,536	13,245	11,999
定期糞便採取調査					
HPAI (H5N1)	0	0	0	0	0
LPAI (分離株数)	14(14)	12(13)	27 (30)	27(27)	27(29)
発生時追加糞便					
検査総数	130* ²	10,248	0	109* ⁴	0
HPAI (H5N1)	0	0	0	0	0
LPAI	0	25	0	0	0
死亡野鳥等調査					
検査総数	185	5,649	444	450	395
HPAI (H5N1)	0	60	0	0	0
LPAI	0	0	2	0	0
発生時捕獲調査					
検査総数	100* ²	100* ³	0	229* ⁴	0
HPAI (H5N1)	0	0	0	0	0
LPAI	0	0	0	0	0

*1 十和田ハクチョウでの発生による調査

*2 愛知県豊橋市でのウズラでの低病原性AIの発生による調査

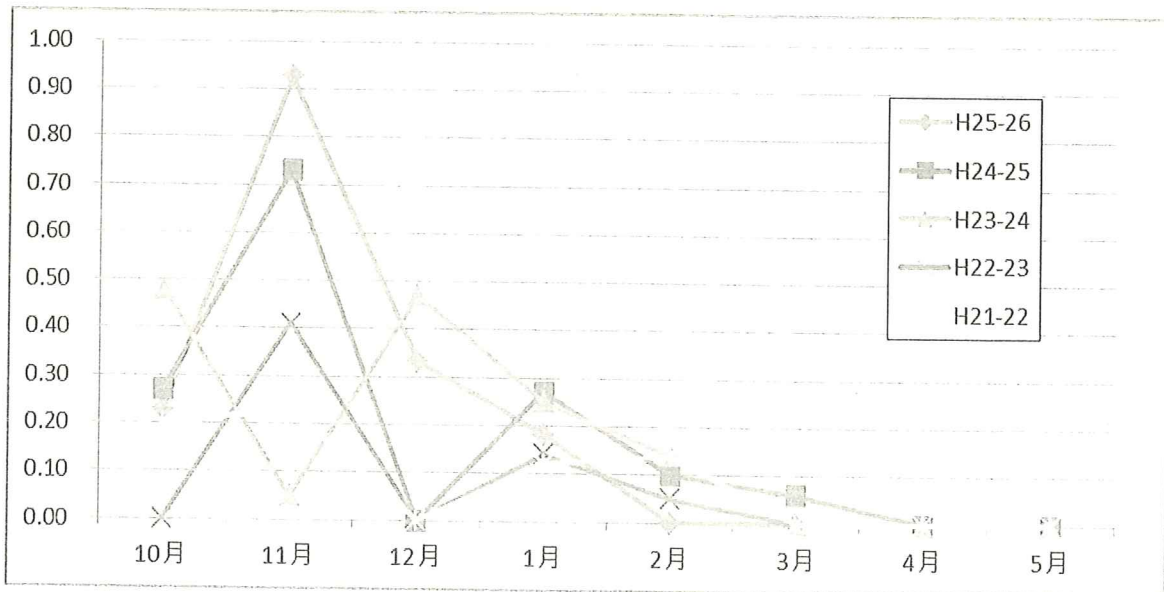
*3 中海・央道湖での発生による調査

*4 中国でのA(H7N9)の発生による追加調査

表2 H25-26 シーズン定期糞便採取調査結果

調査月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	計	
分離亜型(数)	H4N2(1), H5N3(1), H6N5(2), H11N9(1)	H4N1(1), H4N6(3), H4N7(1), H4N8(1), H5N3(4), H6N1(2), H10N3(1), H11N3(1)	H1N1(4), H4N6(2)	H5N2(1), H5N3(1), H6N1(1), H11N9(1)					
分離株数		5	14	6	4		0	29	
分離検体数		5	13	6	3		0	27	
糞便総数	2,216	1,513	1,805	2,192	1,659	1,472	1,142	11,999	

図1 月別分離率



家きんにおける鳥インフルエンザモニタリングの実施状況について
(平成26年6月まで)

年	ウイルス分離検査			抗体検査			備考
	戸数	検査羽数	陽性羽数	戸数	検査羽数	陽性羽数	
平成16年	-	18,825	0	-	16,307	0	
平成17年	-	29,893	0	-	36,773	0	
平成18年	4,220	46,271	0	8,104	87,880	0	
平成19年	4,614	50,995	0	8,055	88,805	0	
平成20年	4,355	44,361	0	7,155	77,289	0	
平成21年	6,396	57,417	0	10,683	101,446	2	1農場
平成22年	4,229	41,942	0	7,878	76,712	0	
平成23年	6,103	61,203	0	9,223	96,131	0	
平成24年	6,243	62,542	0	8,464	84,476	0	
平成25年	6,040	60,601	0	8,309	82,935	1	1農場
平成26年	2,957	29,663	0	3,994	39,830	0	
1月	492	4,936	0	735	7,330	0	
2月	492	4,937	0	728	7,260	0	
3月	494	4,956	0	646	6,450	0	
4月	494	4,956	0	640	6,380	0	
5月	493	4,944	0	686	6,840	0	
6月	492	4,934	0	559	5,570	0	

○平成23年10月1日農林水産大臣公表等に基づき、都道府県において、家きん農場における鳥インフルエンザのモニタリングを実施。

<問い合わせ>

消費・安全局動物衛生課

防疫業務班

電話 03-3502-8292