

從大肚溪口野生水鳥糞便中偵測到 A型流感病毒非結構性基因

陳志豪

為了解台中地區野生水禽類感染A型流感病毒的情形，本實驗室於1992年10月至1993年3月假台中大肚溪口總共採集野生水禽類的糞便拭子共246個樣本。其中包括東方環頸鴉 (*Charadrius alexandrinus*) 86個樣本；中杓鴉 (*Numenius phaeopus*) 26個樣本；濱鴉 (*Calidris alpina*) 74個樣本及黑嘴鷗 (*Larus saundersi*) 60個樣本。所有樣本經無菌處理後接種於9-10日齡雞胚蛋中培養，接種24小時後死亡的雞胚則抽取其尿囊液作血球凝集試驗。陽性反應者其尿囊液則以RT-PCR偵測A型流感病毒非結構性蛋白基因，結果顯示東方環頸鴉糞便拭子樣本中含有此基因片段。經序列及演化分析結果顯示與以往引起嚴重家禽疾病的禽流感病毒非結構性蛋白基因很接近，推論野生水禽一直保存著以前流行過的禽流感病毒部分基因。

關鍵詞：A型流感病毒、水禽、非結構性蛋白基因、演化分析

前 言

流感病毒 (influenza virus) 屬正黏液病毒科 (family Orthomyxoviridae)，以核蛋白 (nucleoprotein; NP) 及質蛋白 (matrix protein; M1) 的抗原性不同可分成A、B、及C三型^[1,3]。A型流感病毒又以血球凝集素 (hemagglutinin; HA) 和神經胺酸酶 (neuraminidase; NA) 的抗原性不同再分成15HA亞型及9NA亞型^[3]。A型流感病毒普遍於人、豬^[4]、馬^[5,6] 及貂^[2] 等動物引起疾病，在蒙古一帶亦有感染駱駝等報告^[7,8]。另外禽流感中H5及H7等亞型均可引起大量雞隻死亡，即所謂雞瘟 (fowl plague)^[9-11]。其他海

洋哺乳類動物如鯨豚類^[12,13]、海獅及海豹^[14,15]等都可分離到A型流感病毒，又以A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) 最著名，該病毒不但引起海獅肺炎及死亡，並可使人產生結膜炎 (conjunctivitis)。而所有水禽類都可以分離到不同亞型組合之A型流感病毒，這些被流感病毒感染之鳥類，絕大部分沒有任何症狀，估計水禽類在流感病毒的演化中扮演病毒基因庫的重要角色^[16,17]。

本研究之目的是希望藉由候鳥中分離的流感病毒基因中，比較其與人、豬、鳥類等動物的流感病毒的關聯性。本研究結果發現東方環頸鴉糞便拭子樣本中含有A型流感病毒非結構性蛋白基因。經序列及演化分析結果顯示與以

往引起嚴重家禽疾病的禽流感病毒非結構性蛋白基因很相似，推論野生水禽可能一直保存著以前曾經造成大流行的禽流感病毒部分基因。

材料與方法

一、樣本採集

從1992年10月至翌年4月假台中縣龍井鄉大肚溪口的水鳥棲息地採集候鳥糞便。採集的方式分為兩種：(1)在鳥群剛飛走後以無菌棉棒沾取新鮮的鳥糞；(2)配合台中市野鳥學會的候鳥繫放活動，直接以無菌棉棒從候鳥的泄殖腔沾取新鮮的鳥糞。所有採集到的鳥糞分別放入保存液（內含等量甘油和2x Eagle's minimum essential medium、10,000 IU/ml的青黴素及10,000 μ g/ml的鏈黴素）中，並置於 -80°C 冰櫃中保存。

二、雞胚胎來源

所採用之無特定病原（specific pathogen-free; SPF）之9-10日齡雞胚胎由臺灣省家畜衛生試驗所購得，並於 37°C 培養箱培養。

三、病毒分離

參考Schafer等之方法^[17]，如下實施：將含鳥糞的保存液作3,000rpm離心30分鐘，取0.2ml上清液以絨毛膜尿囊腔（chorio-allantoic cavity）接種途徑接種於9-10日齡雞胚胎中並在 37°C 培養箱培養。雞胚胎在接種後24小時內死亡者與以丟棄；24小時後死亡者則收集其尿囊液（allantoic fluid）取等量尿囊液與5%雞紅血球懸浮液作快速平板凝集試驗（rapid plate hemagglutination test），陽性反應者再作核糖核酸萃取及聚合酶連鎖反應等試驗。

四、核糖核酸之萃取及純化

病毒核糖核酸（RNA）之萃取係採用RNA分離套組—TRI REAGENT™ LS（Molecular Research Center, Inc.），參照Chomczynski（1993）^[18]之方法經修改後敘述如下：取1份（250 μ l）病毒液與3份（750 μ l）之TRI REAGENT™ LS溶液混合均勻後，在室溫作用

5分鐘，加入200 μ l氯仿（chloroform），猛烈震盪15秒，於室溫靜置15分鐘，將混合物以12,000xg離心15分鐘，取上清液，加入500 μ l之異丙醇（isopropanol），震盪均勻後置入 -80°C 冰櫃中靜置2至8小時後，再以12,000xg離心15分鐘，把上清液丟棄，加入1 ml之70%乙醇（ethanol），混合均勻後再以12,000xg離心15分鐘，再把上清液丟棄，把離心管倒放至完全乾燥為止，最後加入適量之無菌經diethylpyrocarbonate（DEPC）（Amresco）處理過之水溶解RNA後備用。

五、反轉錄酶反應

參考Claas氏等（1992）^[19]之方法，將1 μ g之total RNA溶於水中，於 70°C 加熱10分鐘後置於冰中。加入50 pmol引子，於25 μ l的反應緩衝液（50mM KCl；10mM Tris-HCl, pH8.4；2.5mM MgCl₂；0.02% gelatin；10mM DTT；1mM dNTPs；2 units RNAsin®）中， 42°C 預熱2分鐘後，加入1 μ l M-MLV RT（Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase），繼續反應45分鐘。於 95°C 加熱5-10分鐘中止反應，置於冰中。取5-10 μ l在100 μ l PCR反應緩衝液進行PCR。其餘則存於 -70°C 冰櫃中。本論文所使用於反轉錄酶反應引子：5'-AAGGGCTTTCACCGAAGAGG-3'（核苷酸位置為467-486）。

六、聚合酶連鎖反應

參考Claas氏等（1992）^[19]之方法，每一PCR（polymerase chain reaction）反應取1/5體積的RT產物當模板，加入100 pmole引子於100 μ l PCR反應緩衝液（50 mM KCl；10 mM Tris-HCl, pH8.3；1.5 mM MgCl₂；0.01% gelatin, 200 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP）中，另加入2.5 unit DNA Taq polymerase進行PCR反應。PCR每一個反應包括三個反應步驟：(1) 95°C 變性模板（denature template）DNA 2分鐘。(2) 55°C 使引子及模板雜交配對（annealing）2分鐘。(3) 72°C 2分鐘使DNA Taq polymerase合成引子間的DNA。重複上述循環40次。其中在第一次循環前先以 95°C 變性5分鐘，最後一個循環後再延長

DNA合成時間至7分鐘。本論文中使用於PCR反應的引子對：5'-AAGGGCTTTCACCGAA-GAGG-3' (forward) (核苷酸位置為467-486) 及5'-CCCATTCTCATTACTGCTTC-3' (reverse) (核苷酸位置為656-637)，增幅190bp的PCR產物。

七、PCR 產物之純化及轉殖

PCR產物經2%洋菜凝膠鑿析後以Spin-X管柱純化，隨即接黏 (ligate) 於pGEM-T載體，並轉殖到大腸桿菌—JM109。帶有插入DNA片段且轉化入pGEM-T載體之菌株直接塗磨於含有100 μ g/ml ampicillin，6 μ g/ml X-gal，60 μ g/ml IPTG的LB培養基上，37°C培養箱中培養隔夜後，選擇培養基上長出白色菌落，即為帶有插入DNA片段且轉化入pGEM-T載體 (Promega) 之菌株。將此菌落接種於5ml之LB培養液中，於37°C振盪培養過夜，再以Wizard Minipreps Kit (Promega) 萃取質體DNA。

八、DNA序列分析反應

質體DNA經2M NaOH變性處理後，使用6%的Long Ranger™ (FMC) DNA序列分析膠體溶液，其中包括7M Urea及0.6X TBE緩衝液。本實驗係採用Sanger氏等 (1977) [20]所發明的Dideoxynucleotide chain termination法。取約7 μ l 1.5-3 μ g的單股DNA，加入1 μ l序列引子 (sequencing primer, 1 pmole) 及2 μ l的5X反應緩衝液 (200mM Tris-HCl pH=7.5, 100mM MgCl₂, 250mM NaCl)，至反應總體積為10 μ l。混合均勻後，置65°C作用2分鐘，然後慢慢降溫至低於30°C以下，使序列引子與DNA黏合。然後加入2 μ l標示混合液 (labeling mix, 含7.5M dGTP、dCTP、dTTP，以三次水稀釋5倍)，0.5 μ l [³⁵S]-dATP (6.25 μ Ci, 1,000 Ci/mole)，1 μ l DTT及1 μ l Sequenase (13 units/ μ l, USB, 以TE緩衝液作8倍稀釋)，混合均勻後，置室溫作用5分鐘，然後各加3.5 μ l至預先分裝好2.5 μ l ddNTP (ddATP、ddTTP、ddGTP、ddCTP) 的4根管子中，於37°C反應10-15分鐘，再加入4 μ l終止反應溶

液 (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)，混合均勻後，置75-80°C變性分鐘後，立刻置於冰上。DNA序列分析電泳槽中加入0.6X TBE緩衝液，先預溫半小時，再加入處理好的樣品，以1,700伏特電壓跑1.5-3小時。電泳完成後，膠片以3M濾紙沾起，經80°C真空乾燥2小時，於暗房內壓片，2-3天後洗片並判讀DNA序列。

九、序列來源

流感病毒NS蛋白基因序列皆參考Influenza Sequence Database，其網址為：<http://www.flu.lanl.gov/>。

十、演化樹之描繪

演化樹 (phylogenetic tree) 以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 1.01作分析^[21]。本分析一律採用“Kimura 2-parameter”模式作距離運算^[22]，然後利用“Neighbor-joining”方法^[23]畫演化樹，並重複計算 (bootstrap) 1,000次，最後再以Tree Explorer (version 2.12) 來修飾^[21]。

結 果

一、病毒分離

246個樣本經接種於9-10日齡雞胚蛋中培養後24小時後死亡者有34例，而血球凝集試驗陽性反應者則有5例。經RT-PCR偵測A型流感病毒NS蛋白基因的結果顯示僅東方環頸鴿1例為陽性反應。此基因片段經純化後立即黏接到pGEM-T載體中，序列分析結果顯示確實屬於A型流感病毒的NS蛋白基因序列。為了方便作下列的演化分析，我們把此基因的序列暫時命名為A/plover/Taiwan/93。

二、核酸及胺基酸序列分析

核酸序列分析及胺基酸序列分析結果均顯示A/plover/Taiwan/93的部分NS蛋白基因片段與A/chicken/Taiwan/89 (H6N5)、A/chicken/Brescia/1902 (H7N7)、A/FPV/Dobson/27 (H7N7)

及A/pintail/Alberta/119/79 (H4N6) 等其他鳥類流感病毒的NS蛋白基因片段極為相似，其相似度 (Homology) 平均為97.7%。相反地，與A/chicken/germany/N/49 (H10N7) 及近年來於美國流行的A/chicken/Pennsylvania/13609/93 (H5N2) 比較，其相似度平均祇有79% (Fig.1)。

三、演化分析

為了進一步了解上述東方環頸鴉糞便樣本中偵測到的部分NS蛋白基因片段與其他宿主流感病毒的NS蛋白基因的關聯性，該基因片段經核苷酸序列分析後，便轉送到流感病毒基因庫分別與該基因庫已經登錄的鳥、豬、人、馬及其他哺乳動物的A型流感病毒NS蛋白基因作演化分析並描繪出演化樹。與家禽及其他鳥類比較結果顯示，該基因與以往從雞所分離的流感病毒，A/chicken/Taiwan/89 (H6N5) 的NS蛋白基因非常接近，表示台灣地區家禽與水禽類有互相感染A型流感病毒的可能 (Fig.2)。有趣的是，該基因亦與以前在國外造成雞隻高死亡率的禽流感病毒A/chicken/Brescia/1902 (H7N7)、A/FPV/Dobson/27 (H7N7) 及A/chicken/Victoria/1/85 (H7N7) 的NS蛋白基因亦非常相似，表示以往的禽流感病毒部分基因片段仍然有保留在野生水禽類的可能 (Fig.2)。另外，該基因亦與由加拿大Alberta省從尖尾鴨 (pintail) 所分離到的病毒A/Pintail/Alberta/119/79 (H4N6) 相似，表示禽流感病毒在不同品種的水禽類互相感染，並且藉由遷徙 (Migration) 活動將病毒攜帶到世界各地 (Fig.2)。與豬、馬、海豹及鯨等動物來源的NS蛋白基因比對結果，顯示基因間的相似性差異甚大 (Fig.3, Fig.4)。與人流感病毒NS蛋白基因的相似性亦不大，尤其是與本土分離的流感病毒並沒有太大關係 (Fig.5)。

討 論

本研究採用NS蛋白基因的原因在於此基因為流感病毒的內部基因 (internal gene)，其基因祇會在被病毒感染的宿主細胞中表現產生NS蛋白，病毒顆粒中並不含有此蛋白，NS蛋白基因不會受到宿主免疫系統影響產生異常快速的

突變，其突變速率純粹是自然產生^[24]。因此，NS蛋白基因被視為分子時鐘 (Molecular clock)，並適合作為流感病毒的演化及年代追溯等相關研究之用^[24]。

野生水禽已經被證明為最大的A型流感病毒基因庫。基本上，所有亞型病毒皆能在各種不同的鳥類中分離到。而這些帶有流感病毒的鳥類，大都以無症狀感染為主^[16,25]。在本研究中，雖然在246個樣本中祇從1個樣本中檢測到A型流感病毒的基因，探究其原因可能與實驗操作的技術層面有關。事實上，從NS基因的演化分析結果顯示，A/plover/Taiwan/93與A/chicken/Brescia/1902 (H7N7)、A/FPV/Dobson/27 (H7N7) 及A/chicken/Victoria/1/85 (H7N7) 的NS蛋白基因亦非常相似，顯示出鳥類流感病毒經常互相傳染，並藉由混合感染達到基因交換 (genetic reassortment)，進一步產生新的病毒株，此論點與Schafer等 (1993)^[17]的實驗證據相符。另一方面，臺灣家禽亦有感染禽流感的報告。雖然大都屬於無症狀的感染，但病毒來源一直都不甚清楚^[26]。由本研究則發現A/plover/Taiwan/93的NS蛋白基因與A/chicken/Taiwan/89 (H6N5) 者亦非常接近。此結果對禽流感病毒的來源提供了另一個證據。

在人類的世界中，本世紀總共發生過三次流感病毒的全球性大流行。即1918年的西班牙流感；1957年的亞洲流感；以及1968年的香港流感^[2,3]。在過去這些流感病毒大流行中，已經發現造成亞洲流感及香港流感的流感病毒，部分基因片段是由鳥類提供^[27,28]。雖然亞洲流感病毒從1957年開始流行經過十年後便從人類世界中消失，但從Schafer et al. (1993)^[17]的研究則發現引起1957年的亞洲流感的始祖病毒一直保留在鳥類流感病毒庫中。早年針對NS蛋白基因的演化研究中，則指出人類A型流感病毒和鳥類流感病毒的NS蛋白基因皆屬於同一個祖先病毒，並可追溯到1912年間^[29]。而1918年的西班牙流感，其病毒基因序列一直到最近才從當年因感染流感死亡病人肺臟切片中及在終年被冰封的屍體內臟中被解碼後，證實與豬流感病毒較為接近，但仍不能排除完全與鳥類流感病毒無關^[30]。

以往認為鳥類的流感病毒無法直接感染人

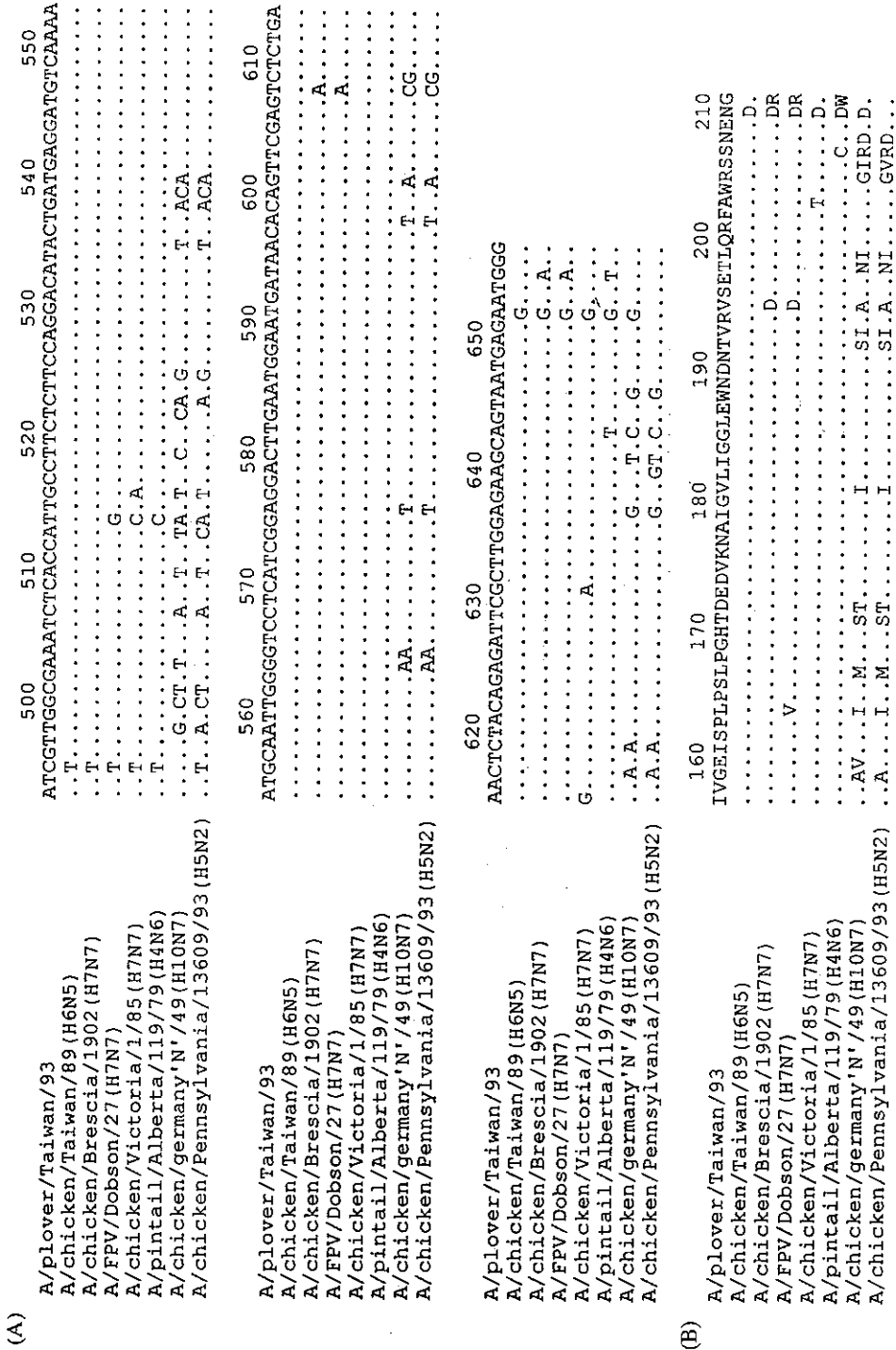


Fig. 1 (A) Comparison of the partial NS nucleotide sequences ranging from 492 to 656 of avian influenza viruses; (B) Comparison of the partial NS amino acid sequences from residues 156 to 210 of avian influenza viruses. Dots indicate nucleotides or amino acid residues that are identical to that of the A/plover/Taiwan/93, respectively.

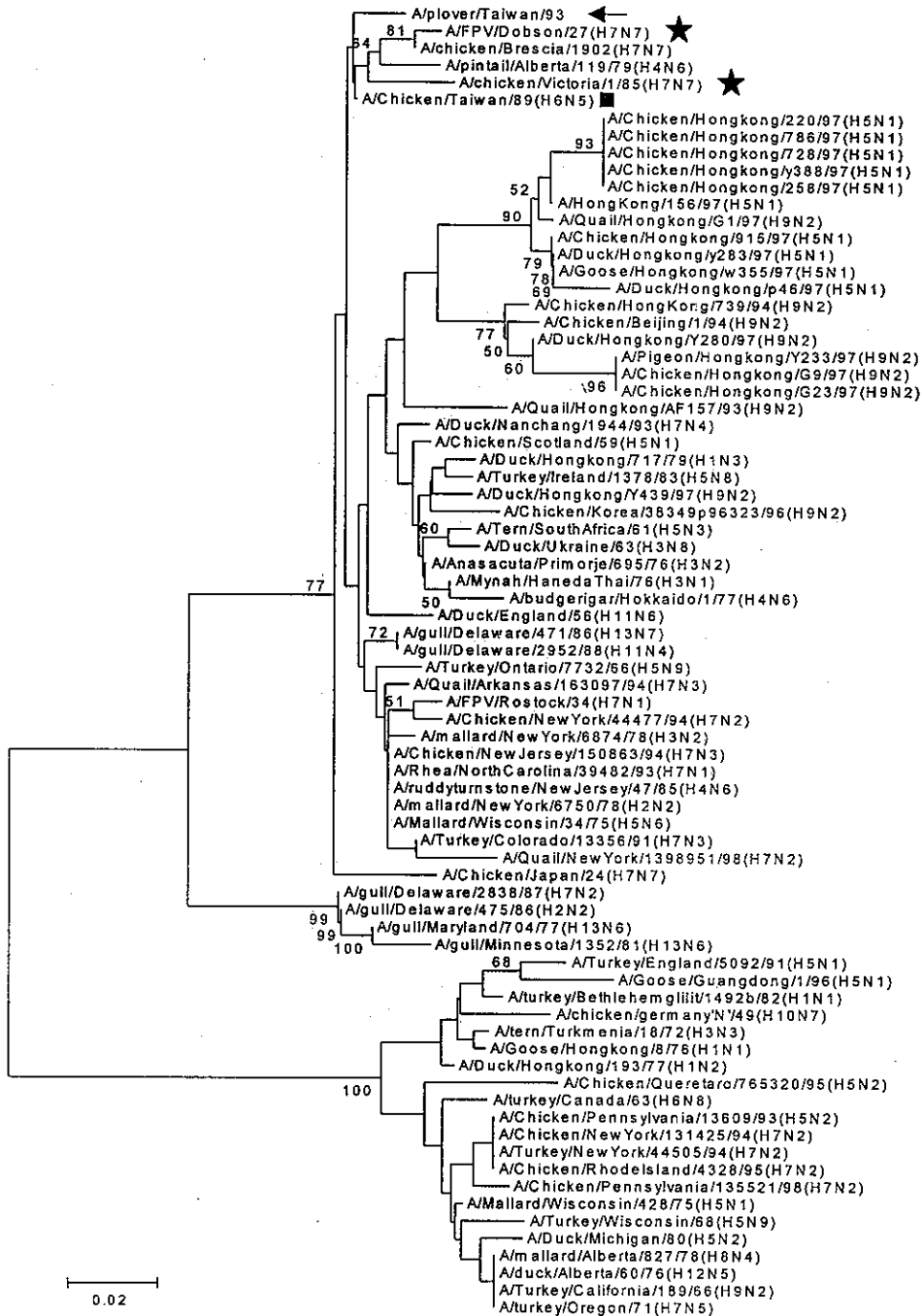


Fig. 2 Phylogenetic relationships among the avian influenza A viruses. An unrooted neighbor-joining tree of partial NS nucleotide sequences was generated followed by 1,000 replications of bootstrap-resampling. The number at each branch point indicates percentage probability that the resultant topology is correct. The lengths of the horizontal lines are proportional to the nucleotide changes between sequences. Vertical lines separate progeny virus lineages at the point where they branch from a theoretical common ancestor. Arrow indicates the position of the NS gene of A/plover/Taiwan/93 in this study. Solid square indicates the position the strain that was isolated from chicken in Taiwan. Solid stars indicate the position of the former virulent strains in other countries.

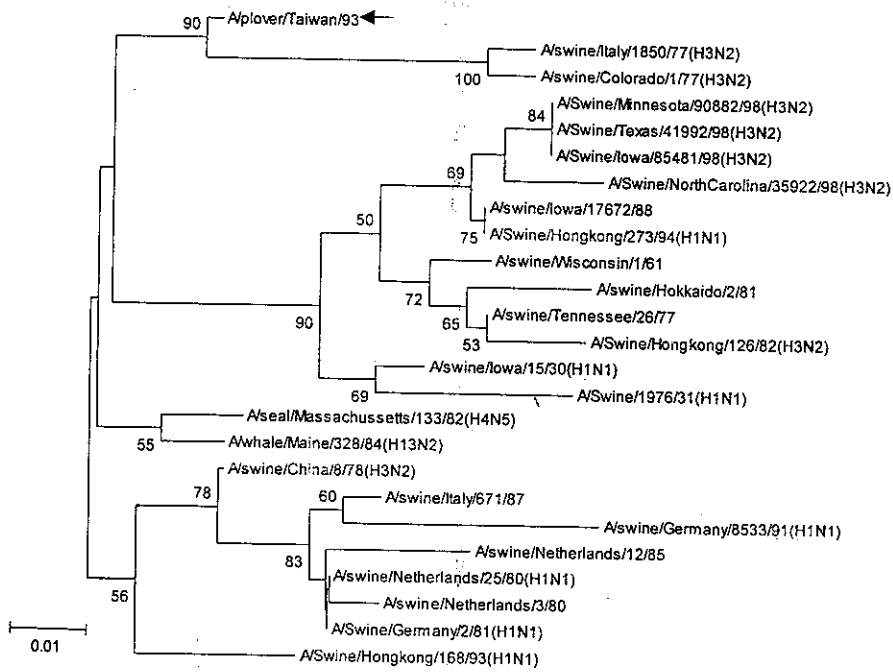


Fig. 3 Phylogenetic relationships among the swine and other mammalian influenza A viruses. Arrow indicates the position of the NS gene of *A/plover/Taiwan/93* in this study. For more information see the legend to Fig. 2.

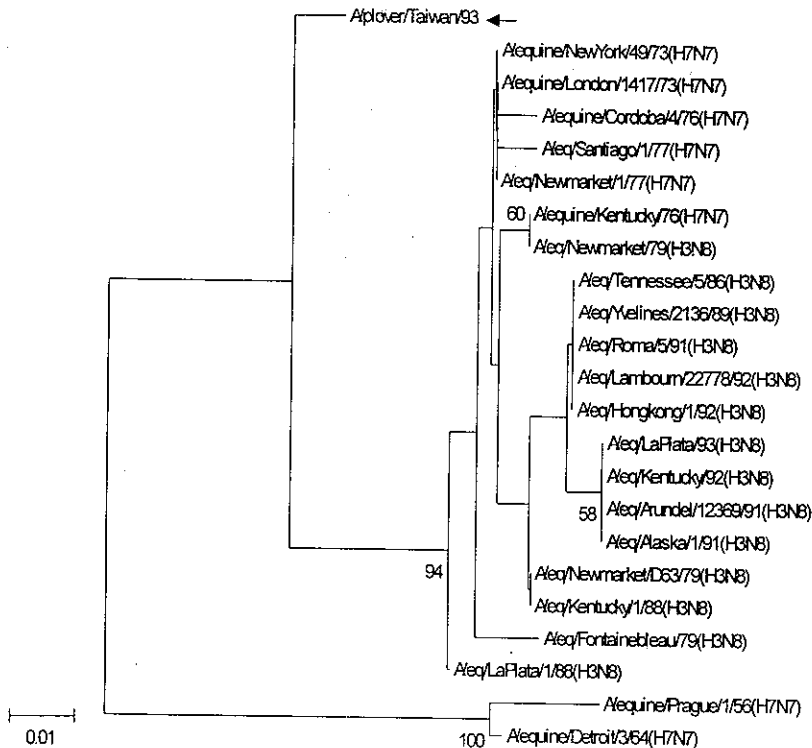


Fig. 4 Phylogenetic relationships among the equine influenza A viruses. Arrow indicates the position of the NS gene of *A/plover/Taiwan/93* in this study. For more information see the legend to Fig. 2.

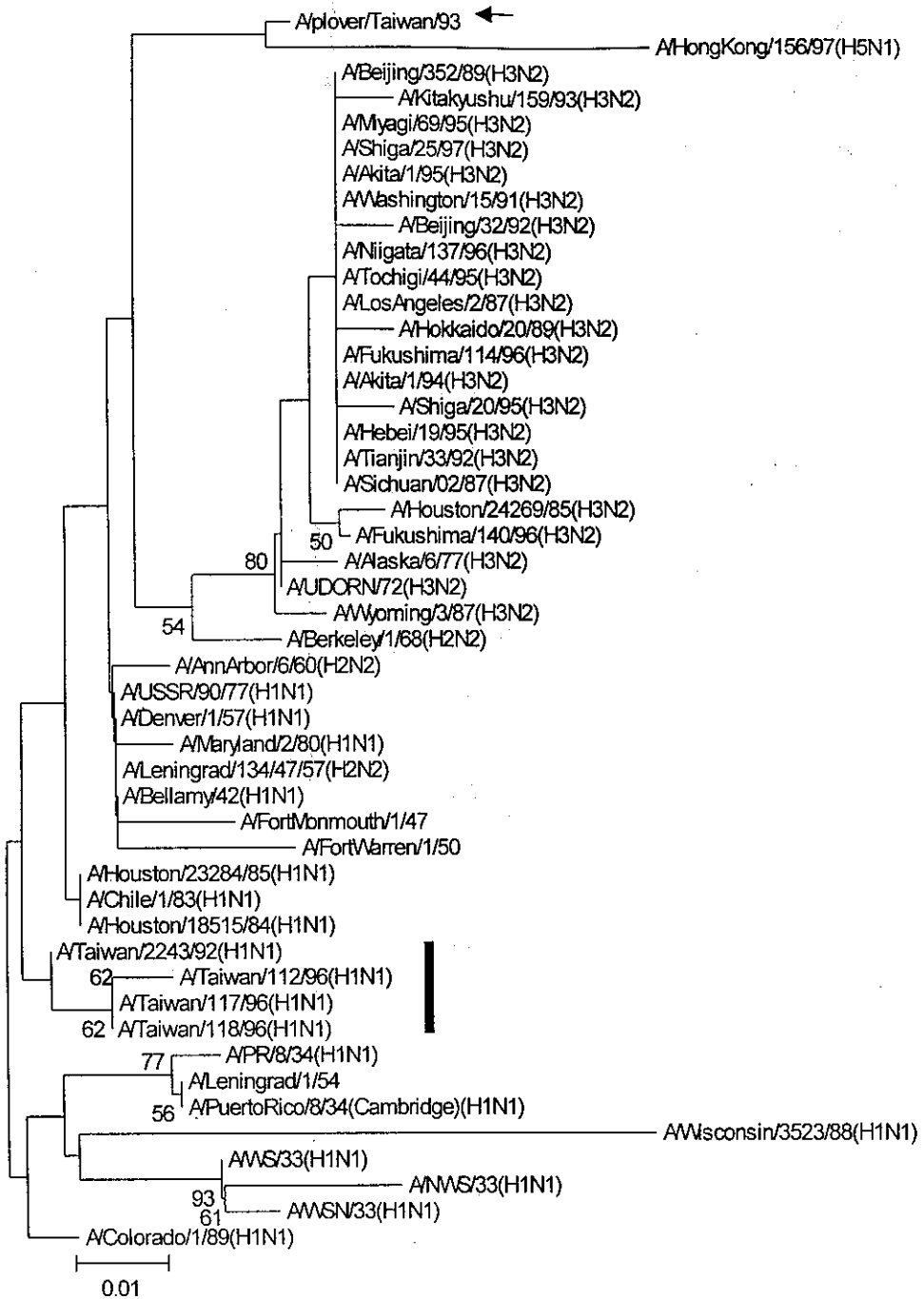


Fig. 5 Phylogenetic relationships among the human influenza A viruses. Arrow indicates the position of the NS gene of A/plover/Taiwan/93 in this study. Solid bar indicates the position of the virus strains that was circulated recently in Taiwan. For more information see the legend to Fig. 2.

類，必須先行感染其他哺乳動物後，才有機會感染人類。而從許多研究報告中則認為豬為A型流感病毒的主要混合皿 (Mixing vessel)，亦即鳥類的流感病毒經感染豬後，在豬體內產生適應性的病毒株後才能感染人類^[2,3]。不過這個觀念於1997年爆發香港禽流感事件後，即被打破。而以往曾經在人類流行已久的A型流感病毒祇有H1N1、H2N2及H3N2等三個亞型，但自從爆發香港禽流感後，現在則需要再加上H5N1和H9N2兩個亞型^[31,32]。因此，除了豬以外，其他哺乳類動物，甚至人類都有可能成為鳥類流感病毒的混合皿，使病毒一旦在人類體內適應後能在人與人之間互相傳染，並有可能產生新的病毒，並引起下一波全世界流感大流行。

結 論

從本研究發現野生水禽中帶有以往引起嚴重家禽疾病的禽流感病毒非結構性蛋白基因，再一次證明野生水禽為流感病毒最大基因庫。而野生水禽卻不像一般家禽可透過海關檢疫來篩選被病毒感染的動物。因此，定期及定點來針對野生水禽設立流感病毒的監測站確有其必要性。另外，除了應用傳統方法作流感病毒的診斷及次分型外，發展更先進及有效的診斷方法如生物晶片技術則是未來趨勢，希望有關單位能夠重視。

致 謝

本論文承蒙台中市野鳥學會協助採集樣本及中山醫學院專題計畫CSMC-81-019經費獎助，特致謝忱。

參考文獻

1. Matthews REF: Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. S. Karger, Basel, 1979.
2. Murphy BR, Webster RG: Orthomyxoviruses. In Fields BN et al (Eds): Virology, Ed2 New York, Raven Press, 1990: 1091.
3. Murphy BR, Webster RG: Orthomyxoviruses. In Fields B. N. et al (Eds): Virology Ed3 New York, Raven Press, 1996: 1397.
4. Altmuller A, Kunerl M, Muller K, et al: Genetic relatedness of the nucleoprotein (NP) of recent swine, turkey, and human influenza A virus (H1N1) isolates. Virus Res 1991; 22: 79-87.
5. Waddell GH, Teigland MB, Sigel MM: A new influenza virus associated with equine respiratory disease. J Am Vet Med Asso 1963; 143: 587-590.
6. Daly JM, Lai ACK, Bins MM, et al: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. J Gen Virol 1996; 77: 661-671.
7. Hinshaw VS, Webster RG: The natural history of influenza A viruses. In Beare AS (Eds): Basic and applied influenza research, Boca Raton, Fla. CRC Press, Inc., 1982: 79-104.
8. Yamnikova SS, Mandler J, Bekh-Ochir Zh, et al: A reassortant H1N1 influenza A virus caused fatal epizootics among camels in Mongolia. Virology 1993; 197: 558-563.
9. Alexander, DJ: Avian influenza recent developments. Vet Bull 1982; 52: 341-359.
10. Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R, et al: Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/Chick/Penn/83 (H5N2). Virology 1989; 168: 274-280.
11. Vey M, Orlich M, Adler S, et al: Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. Virology 1992; 188: 408-413.
12. Lvov DK, Zhdanov VM, Sazonov AA, et al: Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. Bull WHO 1978; 56: 923-930.

13. Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci J, et al: Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* 1986; 58: 655-656.
14. Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ, et al: Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* 1981; 113: 712-724.
15. Garcia JR, St Aubin DJ, Barker IK.: Mass mortality of harbor seals: Pneumonia associated with influenza A virus. *Science* 1982; 215: 1129-1131.
16. Hinshaw VS, Webster RG, Bean WJ, et al: The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1981; 3: 155-164.
17. Schafer, JR, Kawaoka Y, Bean WJ, et al: Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology* 1993; 194: 781-788.
18. Chomczynski P: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTech* 1993; 15: 532-537.
19. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, et al: Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992; 39: 1-13.
20. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
21. Kumar S, Tamura K, Nei M: MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802. 1993.
22. Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111-120.
23. Satiou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-425.
24. Buonagurio DA, Nakada S, Parvin JD, et al: Evolution of human influenza A viruses over 50 years: rapid, uniform rate of change in NS gene. *Science* 1986; 232: 980-982.
25. Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, et al: Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: Distribution patterns and biological significance. *J Virol* 1997; 71: 6128-6135.
26. Chan CH, Shieh HK, Lu YS, et al: Study on avian influenza in Taiwan, R.O.C. I. Epidemiology, viral isolation and identification. *Taiwan J. Vet. Med. Ani. Hus.* 1989; 53: 75-88.
27. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG: Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989; 63: 4603-4608.
28. Kida H, Kawaoka Y, Naeve CW, et al: Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks. *Virology* 1987; 159: 109-119.
29. Ludwig S, Schultz U, Mandler J, et al: Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 1991; 183: 566-577.
30. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, et al: Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 1997; 275: 1793-1796.
31. Xu X, Subbarao K, Cox NJ, et al: Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 1999; 261: 15-19.
32. Shortridge KF, Gao P, Guan Y, et al: Interspecies transmission of influenza viruses: H5N1 virus and a Hong Kong SAR perspective. *Vet Microbiol* 2000; 74: 141-147.

Detection of Nonstructural Gene of Influenza A Virus from Wild Waterfowl in Datu Estuary Area

Chi-Ho Chan

In order to understand the prevalence of influenza A virus among migratory waterfowls in the Taichung area of Taiwan, a total of two hundred and forty-six samples of cloacal swabs, including 86 samples from eastern Kentish plovers (*Charadrius alexandrinus*), 26 from whimbrels (*Numenius phaeopus*), 74 from dunblins (*Calidris alpina*), and 60 from Saunder's gulls (*Larus saundersi*) were collected. All samples were injected into 9 to 10 day-old chick embryos after supplement of antibiotics and ultrafiltration. After 24 hours, the allantoic fluid of the dead embryos underwent Hemagglutination

(HA) test. The positive HA test samples were further studied by RT-PCR for the presence of the nonstructural (NS) protein gene of influenza A virus. The result indicated only one of the cloacal samples from eastern Kentish plovers to be positive. The PCR product was then subjected to DNA sequencing and analyzed phylogenetically. The results indicated that both the NS gene found in the isolate of this study and that of a formerly prevalent strain were closely related, suggesting that the gene of the avian influenza virus, which was once prevalent in domestic fowls, might still persist among waterfowls.

Key words: influenza A virus, waterfowl, nonstructural protein gene, phylogenetic analysis