

桃園縣復興鄉白蛉調查及白蛉感染原蟲檢驗方法

鄧華真、呂良振、簡淑婉、嵇達德、林巧

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

摘要

利什曼原蟲症 (leishmaniasis) 由利什曼原蟲引起，經由白蛉作為傳播媒介，雌白蛉藉叮咬人類而將病原體傳至人體內，引起黑熱病 (內臟型利什曼原蟲病)、皮膚利什曼原蟲病、巴東氏菌病及白蛉熱等傳染病。本次調查桃園縣復興鄉山區 95 年病患住家及其周遭環境，以了解當地白蛉的種類以及白蛉的原蟲感染率。實驗分三組進行，均使用 2 種誘蚊燈 (外加乾冰誘引)、蓖麻油黏紙、羽化採集器、吸蟲機、人工吸蟲管等工具採集白蛉。此次調查共採集白蛉 1 種 102 隻 (62 ♀ 40 ♂)，而種類經鑑定為台灣應氏司蛉 *Sergentomyia iyengari taiwanensis*。調查工具以誘蚊燈外加乾冰誘引效果最好，CDC 誘蚊燈誘集到 39 ♀ 31 ♂，下吸式黑燈管誘蚊燈次之，採集到 16 ♀ 5 ♂，接著為人工採集及蓖麻油黏紙，分別採集到 7 ♀ 2 ♂ 及 1 ♂。其中採集之白蛉雌蟲 47 隻，利用定量聚合酶鏈鎖反應檢驗體內是否感染利什曼原蟲，結果皆為陰性。此檢驗的敏感度為單隻白蛉體內有 3.42 隻原蟲以上即可測得。

關鍵字：利什曼原蟲、白蛉、定量聚合酶鏈鎖反應、採集方法、桃園縣

前言

白蛉屬於昆蟲綱雙翅目長腳亞目白蛉科，與蚊蟲同一亞目但不同科，可傳播黑熱病 (內臟型利什曼原蟲病)、皮膚利什曼原蟲病、巴東氏菌病及白蛉熱等病。目前全世界利什曼原蟲病病例估計約有一仟二百萬例，每年新增

西元 2008 年 2 月 12 日受理；西元 2008 年 3 月 5 日接受刊載

通訊作者：鄧華真；聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

E-mail：hjteng@cdc.gov.tw

病例爲一百五十萬至二百萬例（皮膚利什曼原蟲病爲一百萬至一百五十萬例，黑熱病五十萬例，死亡病例超過五萬例），其中 90%以上的皮膚利什曼原蟲病例發生於伊朗、阿富汗、敘利亞、沙烏地阿拉伯、巴西及祕魯〔1〕，而 90%以上的黑熱病病例發生於孟加拉、巴西、印度、尼泊爾、衣索比亞及蘇丹〔2, 3〕。中國大陸有許多地區目前仍有利什曼原蟲病的流行。在台灣 1942 年至 1958 年曾有境外移入的黑熱病病例報告，隨後並於 1968 年及 1970 年在新竹縣尖石鄉發現本土性皮膚利什曼原蟲病確定病例各一例〔4〕，而最近（94 年 5 月）亦於桃園縣復興鄉發現 1 個本土性皮膚利什曼原蟲病確定病例，檢出之原蟲爲 *Leishmania tropica* Wright〔5〕。

全世界白蛉種類有 600 多種，分 5 屬，依中國大陸學者之分類，中國大陸的白蛉有舊世界的白蛉屬 *Phlebotomus*、司蛉屬 *Sergentomyia*、異蛉屬 *Idiophlebotomus* 及新世界兩屬〔6〕，依 Lewis 等西方學者則爲舊世界的白蛉屬、司蛉屬、新世界的盧蛉屬 *Lutzomyia*、*Brumptomyia* 及 *Warileya*〔7-9〕。其中白蛉屬及盧蛉屬吸食人及哺乳類等溫血動物的血，爲病媒種類，全世界約有 30 種白蛉病媒，而司蛉屬專吸冷血動物，異蛉屬則吸食蝙蝠。大陸有 40 多種白蛉，傳播利什曼原蟲的病媒種類爲中華白蛉 *Phlebotomus chinensis* Newstead、吳氏白蛉 *P. wui* Yang and Xiong、亞歷山大白蛉 *P. alexandri* Sinton、及長管白蛉 *P. longiductus* Nitzulescu〔6〕。台灣地區白蛉最早的紀錄報告在 1940 年宜蘭縣大同鄉所採集的雄蛉 1 隻，之後在 1966 年報告於台灣地區 6 縣市 19 鄉鎮進行調查，使用誘蚊燈、棲息場所目視法吸蟲、以猴子爲誘餌的採集帳、Magoon 陷阱器、馬來氏採集帳等方法誘集到 8 種 1,558 隻白蛉，種類包括江蘇白蛉 *P. kiangsuensis* Yao and Wu、台灣應氏司蛉 *Sergentomyia iyengari taiwanensis* Cates and Lien、鮑氏司蛉 *S. barraudi* Sinton、鱗胸司蛉 *S. souamipleuris* Newstead〔10〕及 4 種未知種〔4〕。最近一次的調查在 1995 年 7 月至 1996 年 6 月，於台灣地區 9 縣市 16 鄉鎮利用 3 種誘蚊燈、馬來氏採集帳及人工採集進行調查，共採集 6 種 979 隻白蛉，種

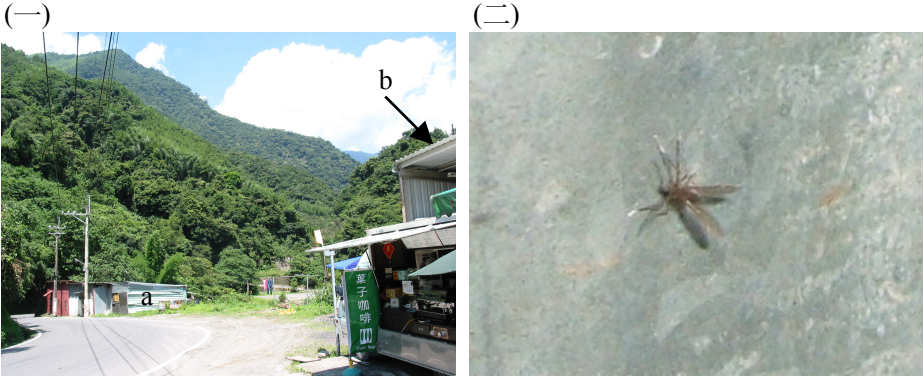
類包括台灣應氏司蛉、鱗胸司蛉、鮑氏司蛉及 3 種未紀錄種〔11〕。

白蛉因孳生範圍廣且種類不同，須有多種採集方法同時進行，常見的採集方法包括塗上蓖麻油的黏紙、誘蚊燈、羽化採集器、掛白布採集法、人餌採集法、棲息場所人工採集、住家殺蟲劑擊昏採集法、馬來氏採集帳等，而這些方法又以誘蚊燈誘集的效果最佳〔12〕，而在台灣的研究除誘蚊燈可吸引較多的白蛉隻數外，馬來氏採集帳卻可採獲最多的白蛉種類〔11〕。白蛉種類的鑑定與體內原蟲感染的檢驗，常使用傳統鏡檢方法，後來分子生物技術也發展來進行形態十分相似的白蛉種類鑑定〔13〕，並建立 kDNA 聚合酶鏈鎖反應、螢光定量聚合酶鏈鎖反應等原蟲檢測方法〔14-16〕。雖曾發現 3 例本土性病例，但未曾有白蛉的病媒鑑定種類，因此本研究將調查最近發現病患的住家及其周遭環境，利用多種白蛉採集方法，進行調查採集，了解該點白蛉孳生現況及種類，並建立分子生物方法檢測白蛉感染利什曼原蟲的可能。

材料與方法

一、採集地點描述

採集地點為桃園縣復興鄉山區（北緯 24° 44'，東經 121° 20'），為 94 年病患住家及其附近（圖一、(一)）。目前該住家無人居住，旁有鐵皮屋商家營業至晚上 9 點，中間一條柏油馬路，馬路另一邊靠山，山上有一戶人家，有養狗及雞。



圖一、(一)桃園縣復興鄉目前無人居住的利什曼原蟲病患者住家(a)及其周遭環境(二)台灣應氏司蛉 *Sergentomyia iyengari taiwanensis* 於晚上停息在照片右邊一座鐵皮屋(b)外牆牆腳。

二、白蛉採集及鑑定

本次調查時間在白蛉最活躍的季節-七月進行，同時因為白蛉的種類多樣，宜採用多種採集方法，所以此次調查，分 3 組，每組約 6-7 人，每組使用 6 種採集方法：(一) 蓖麻油黏紙 (20 x 21 公分)：以長竹筷固定離地 20 公分，放置於住家外有老鼠通道處 1 個晚上，每組放 5 個，共放置 15 個。(二) 加乾冰 CDC 誘蚊燈 (Model 512; John W. Hock, Gainesville, FL)：離地面 50-75 公分懸掛，放置於住家外 1 個晚上，每組 1 台，共 3 台。(三) 加乾冰下吸式黑燈管誘蚊燈 (Model 1312; John W. Hock, Gainesville, FL)：離地面 50-75 公分放置，放置於住家外 1 個晚上，每組 1 台，共三台。(四) 羽化採集器：大漏斗 (直徑 20 公分) 上綁一個採集塑膠袋，放置於老鼠洞口上面 1 個晚上，每組 2 個，共 6 個，但其中一組因採集點為馬路邊，1 個採集器遺失，另 1 個倒置。(五) 吸蟲機 (John W. Hock, Gainesville, F)：天黑前，以 2 台吸蟲機吸取住家內外牆壁，附近植物、石頭縫等地方，每組 30 分鐘。(六) 人工吸蟲管：於天黑後，在住家牆壁內外、石頭細縫等處，以手電筒照射，尋找白蛉，並以吸蟲管直接吸取，放入紙杯，加 10%糖水棉花，每組 1 個小時。其他方法採集的檢體則放入乾冰箱，均帶回疾病管制局昆陽實驗室，活

的白蛉先凍死後，所有鑑定檢體經 20% 酚複紅液 (Carbal fuchsin) 染色，以顯微鏡依傳統分類特徵 (腹部背上體毛、口腔內的口甲及色板、咽部咽甲、雌蛉受精囊、雄蛉外生殖器等)，鑑定種類及性別 [6,10,17]。再將檢體放置 -20 °C 保存，作為後續原蟲檢驗之用。另外，因白蛉採集隻數不多，故以總合進行分析，並假設所有採集方法效果相同，以 χ^2 檢定來比較方法的採集效果。

三、利什曼原蟲檢驗

參考並修正 Wortmann 等 [18] 及 Gomez-saladin 等 [14] 所使用的 DNA 萃取套組及螢光定量聚合酶鏈鎖反應 (fluorogenic real-time PCR) 來進行野外白蛉感染利什曼原蟲之檢驗。茲將步驟簡要敘述於後：首先將單隻白蛉雌蟲放入 1.5 mL 的離心管中，加入玻璃珠及 PBS 緩衝液，使用組織研磨機 (Retsch, Haan, German) 將蟲體充分磨碎，形成均質化樣本溶液。然後使用 DNeasy® 血液及組織 DNA 萃取套組 (Cat no. 69506, Qiagen, Austin, Texas)，依照製造商建議步驟萃取 DNA，萃取之 DNA 萃取液放置於冰箱冷藏保存 (2-8°C)，作為後續螢光定量聚合酶鏈鎖反應之用。

取 2 μ l DNA 萃取液作為螢光定量聚合酶鏈鎖反應所需之模板，原料混合物包括 Taqman® universal PCR master mix、利什曼原蟲屬引子 (0.5 μ M LEISU1 5'-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT-3' 及 0.5 μ M LEISL1 5'-GACGCACTAAACCCCTCCAA-3') (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 及螢光探針 (0.1 μ M LEISP1 5'-CGGTTCGGTGTGTGGCGCC-3') (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)。在上述原料混合完全後，放入反應儀器中作用 (ABI PRISM 7000, PE Applied Biosystems, Foster City, CA)，作用溫度及時間：先加熱至 50°C 2 分鐘，接著以 95°C 10 分鐘讓聚合酶活化，再進行 PCR 反應 45 個循環 (95°C 15 秒及 60°C 1 分鐘)，以進行聚合酶鏈鎖反應。當目標片段 (利什曼原蟲 16s rRNA 基因) 存在時，會與探針接合釋出螢光，經由儀器接受訊號，隨著反應循環數的增加，訊號強度亦隨之增強。白蛉雄蟲因為不吸血，不會感染利什曼原蟲，所以將單隻雄蛉混合利什曼原蟲 180

μl (1.89×10^3 隻/ml) (中央研究院李旭東博士實驗室提供 *L. donovani* 利什曼原蟲) 當作檢驗全程陽性對照組, 單隻雄蛉當作全程陰性對照組, 另外以 5 的倍數進行原蟲 Genomic DNA 的稀釋, 檢驗螢光定量聚合酶鏈鎖反應的敏感度, 並決定此反應陽性對照組的 DNA 濃度為 $38 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 或 $190 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 而不加模板為陰性對照組。

結果與討論

此次調查共採集白蛉 1 種 102 隻 (62 ♀ 40 ♂), 而種類為台灣應氏司蛉 (圖一、(二)及表一)。此點與早期調查相同, 均於桃園縣復興鄉採獲台灣應氏司蛉, 但 1966 年與 1995 年同時也採集到鮑氏司蛉, 而 1985 年則未鑑定種類 [4, 10, 11]。桃園縣復興鄉及新竹縣尖石鄉截至目前為止, 雖曾有本土性皮膚利什曼原蟲病例報告, 也曾於病患住家及其附近進行為期 3 年的病例監測及環境體檢檢驗 (包括狗、貓、老鼠、鳥、爬蟲類、兩棲類、白蛉等), 但沒有結果 [4]。白蛉的種類鑑定均依靠傳統的形態鑑定方法, 細微繁瑣且必須要有足夠的文獻參考方能完成。所以未來若能使用分子生物技術, 來鑑定台灣地區白蛉的種類、白蛉吸血源分析及周遭宿主的感染, 並配合此篇所建立的白蛉感染原蟲檢驗方法, 長期採樣, 當可釐清台灣地區白蛉病媒種類的問題。

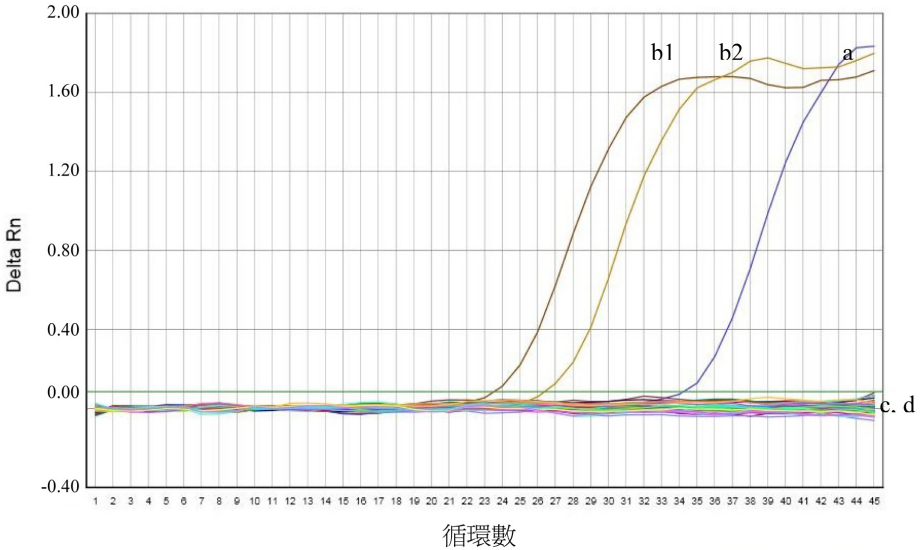
表一、2007 年 7 月桃園縣復興鄉利用不同採集方法採集白蛉隻數。

採集方法	組	每組 數目	採集 時間	台灣		白線斑蚊		白肋小蚊		熱帶家蚊		其他蚊種*			
				應氏司蛉		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
				♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
CDC 誘蚊燈	3	1 個	1 晚	39	31	10	4	14	0	2	0	7	0		
下吸式黑燈	3	1 個	1 晚	16	5	10	1	1	0	8	0	9	1		
管誘蚊燈	3	6 人	60 分鐘	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0		
人工吸蟲管	3	5 個	1 晚	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		
篋麻油黏紙	3	1 個	30 分鐘	0	0	12	10	0	0	0	0	1	0		
吸蟲機採集	2	2 個	1 晚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
羽化採集器	2	2 個	1 晚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
合			計	62	40	32	15	15	0	10	0	18	1		

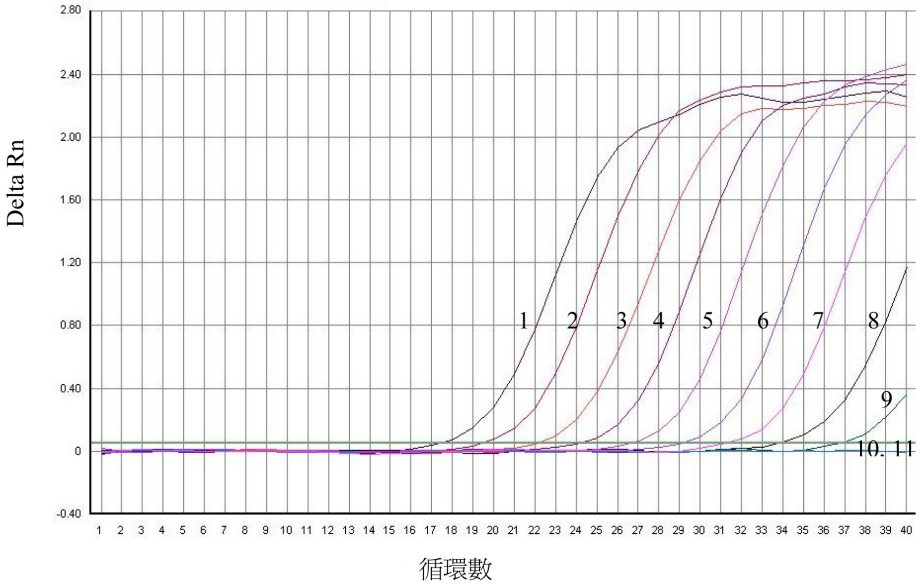
* 其他蚊種包括白腹叢蚊 *Armigeres subalbatus* Coquillett、孳生叢蚊 *Armigeres omissus* Edwards、側白黃蚊 *Ochlerotatus albolateralis* Theobald、馬氏斑蚊 *Aedes malikuli* Huang、三斑家蚊 *Culex tritaeniorhynchus* Giles、灰胸家蚊 *Culex pallidothorax* Theobald 及竹生翠蚊 *Tripteroides bambusa* Yamada。

此次調查採用之 6 種採集方法，其誘蟲效果有顯著差異 ($\chi^2 = 218$, $df = 5$, $P < 0.001$)，以誘蚊燈外加乾冰誘引效果最好，CDC 誘蚊燈誘集到 39 ♀ 31 ♂，下吸式黑燈管誘蚊燈次之，採集到 16 ♀ 5 ♂，接著為人工採集及蓖麻油黏紙，分別採集到 7 ♀ 2 ♂ 及 1 ♂。此次於下午 16:00-17:00 所採用的吸蟲機，意外的沒有採集到白蛉，顯示吸蟲機所吸的地方，包括路邊石洞、雜草、牆壁等處，均非白蛉成蟲棲息的場所。但是若將吸蟲機在白蛉活動時間（即天黑後，約 19:00 以後），採集建築物內外牆的牆腳、堤岸、石頭、雜草堆等處，將是採集白蛉的有效方法。另外此次調查的經驗發現，白蛉體型很小，約 1.5-5.0 mm，所有採集袋的網目一定要夠小，否則會造成體小的白蛉逃逸，而影響調查的結果。

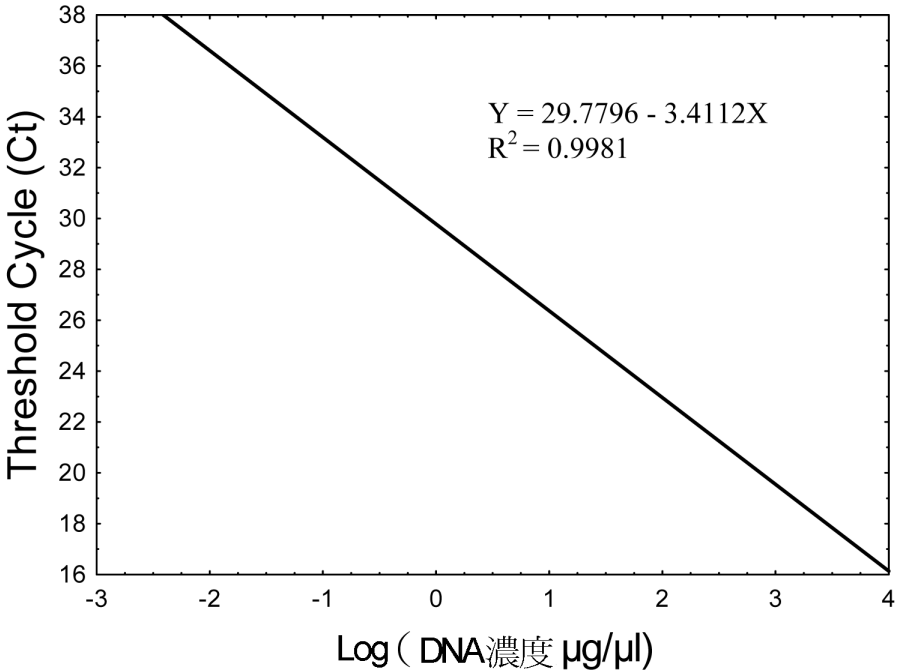
利用螢光 real-time PCR 來分析白蛉感染利什曼原蟲狀況，共檢驗雌蛉 47 隻，結果均為陰性（圖二）。螢光定量聚合酶鏈鎖反應的陽性對照組（Genomic DNA）於第 23-24 及 26-27 循環開始上升，Ct 值分別為 23.85 及 26.66。全程陽性對照組（白蛉雄蟲加利什曼原蟲）則在第 34-35 循環時，開始螢光訊號上升，Ct 值為 34.57。而其他均低於背景值。另經系列稀釋 Genomic DNA，以定量聚合酶鏈鎖反應測定發現稀釋 5 倍（DNA 濃度為 $4.75 \mu\text{g/ml}$ ），可於 18-19 循環檢出，最後檢出濃度為稀釋 5^9 倍（DNA 濃度為 $1.22 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ），在第 37-38 循環檢出，此濃度相當於一隻白蛉體內有 3.42 隻原蟲（圖三）。以 Ct 值與 DNA 量作線性標準曲線分析圖（圖四），線性方程式為 $Y = 29.7796 - 3.4112 X$, $R^2 = 0.9981$ 。雖然螢光定量聚合酶鏈鎖反應很靈敏，但因為白蛉原蟲感染率即使在流行地區也僅有 0.18-7.7% [15, 19]，所以應採行利用分子生物技術大量篩選的策略 [16]，並配合人或動物病例的資訊，於病例附近採集大量白蛉樣本，以利什曼原蟲群體引子進行篩選，陽性結果再以基因定序比對，鑑定原蟲種類。



圖二、使用螢光定量聚合酶鏈鎖反應檢驗 2007 年 7 月桃園縣復興鄉採集的 47 隻白蛉蟲結果。a 為全程陽性對照組（白蛉雄蟲加利什曼原蟲），b 為螢光定量聚合酶鏈鎖反應的陽性對照組（b1：genomic DNA 濃度 0.19 $\mu\text{g/ml}$ ，b2：genomic DNA 濃度 38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ），c 為全程陰性對照組（單隻白蛉雄蟲），d 為螢光定量聚合酶鏈鎖反應無模組的陰性對照組，其他背景線條為 47 隻白蛉陰性結果。



圖三、以螢光定量聚合酶鏈鎖反應檢測不同濃度（5 倍稀釋）利什曼原蟲 Genomic DNA 之敏感度。DNA 濃度為分別為（1）4.75 $\mu\text{g/ml}$ （2）0.95 $\mu\text{g/ml}$ （3）0.19 $\mu\text{g/ml}$ （4）38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （5）7.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （6）1.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （7）0.304 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （8） $6.08 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ （9） $1.216 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ （10） $2.432 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ （11） $4.864 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。



圖四、以螢光定量聚合酶鏈鎖反應作利什曼原蟲 Genomic DNA 之標準曲線分析圖。

誌謝

本研究得以順利完成，特別感謝中央研究院生物醫學研究所李旭東博士提供利什曼原蟲作為分子生物檢驗方法的陽性對照組，並疾病管制局 96 年病媒族群調查訓練學員王任鑫、王欽賢、林建生、柯海韻、梁昭華、陳主慈、陳美珠、陳鈺欣、陳琬菁、葛應豐、潘淑玲、蔡玉琪、蔡璧妃、鄭玉新、二組林志雄、研究檢驗中心陳健福、二分局陳美蓉、黃健浩、三分局陳安汝等同仁協助白蛉調查採集。

參考文獻

1. Volf P, Ozbek Y, Akkafa F, et al. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in

- Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol* 2002; 39: 12-5.
2. World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly Epidemiol Rec* 2002; 44: 365-72.
 3. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews/Microbiology* 2007; 5: S7-16.
 4. Cross JH, Gunning JJ, Drutz DJ, et al. 1985. Autochthonous cutaneous-subcutaneous leishmaniasis on Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 254-6.
 5. Wang JR, Lee ST, Juan WH, et al. Indigenous leishmaniasis in Taiwan: report of a case. *International J Dermatology* 2008; 47: 40-3.
 6. Lu PL, Wu HY. Classification and identification of important medical insects of China. Henan Science and Technology Publishing House, Henan, China. 2003; 229-57.
 7. Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, et al. Proposals for a stable classification of the phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol* 1977; 2: 319-32.
 8. Rispaill P, Leger N. Numerical taxonomy of old world Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. restatement of classification upon subgeneric morphological characters. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1998; 93: 787-93.
 9. Tesh RB, Guzman H. Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty B, Marquardt WC, Eds. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado. 1996; 117-27.
 10. Cates MD, Lien JC. The Phebotomus of Taiwan. *J Med Entomol* 1970; 7: 529-43.
 - 11, Lin TH, Chung CL, Lu LC, et al. The distribution of sandfly on Taiwan.

- Annual reports of the National Institute of Preventive Medicine, Department of Health, 1996. 1997; 210-8.
12. Toprak S, Ozer N. Distribution of sand fly (Diptera: Psychodidae) species and efficiency of capturing methods in Sanhurfa Province, Turkey. *J Med Entomol* 2007; 44: 23-8.
 13. Mukhopadhyay J, Ghosh K, Braig HR. Identification of cutaneous Leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta Tropica* 2000; 76: 277-83.
 14. Gomez-saladin E, Doud CW, Maroli M. Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 138-41.
 15. Guerbouj S, Chemkhi J, Kaabi B, et al. Natural infection of *Phlebotomus* (Larrousius) *langeroni* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* in Tunisia. *Trans Royal Trop Med Hyg* 2007; 101: 372-7.
 16. Kato H, Uezato H, Gomez EA, et al. Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 324-9.
 17. Sawalha SS, Shtayeh MS, Khanfar HM, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Palestinian west bank: potential vectors of leishmaniasis. *J Med Entomol* 2003; 40: 321-8.
 18. Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, et al. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 583-7.
 19. Hashiguchi Y, Gomez EAL, de Coronel VV, et al. Natural infections with promastigotes in man-biting species of sand flies in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 440-6.