

計畫編號：DOH102-DC-2212

衛生福利部疾病管制署 102 年委託科技研究計畫

計畫名稱：日本與台灣病媒蚊及病媒蚊傳播之病原基因關係

年度研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗及疫苗研發中心

計畫主持人：鄧華真

研究人員：羅林巧、王倍峯、陳典煌、呂良振

執行期間： 102 年 01 月 01 日至 102 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應
事先徵求本署同意*

目 錄

目次	頁碼
壹、摘要.....	(5)
貳、本文	
一、前言.....	(7)
二、材料與方法.....	(8)
三、結果.....	(12)
四、討論.....	(21)
五、結論與建議.....	(22)
五、重要研究成果及具體建議.....	(22)
六、參考文獻.....	(23)

圖一、尖音家蚊群及其姊妹種之世界分布圖·····	(7)
圖二、ACE-2 基因序列 PCR 產物圖·····	(10)
圖三、ACE-2 基因定序區域圖·····	(11)
圖四、Lane1~5 為地下家蚊檢體(610 bp)，lane 6~10 為 熱帶家蚊檢體(274 bp) ·····	(14)
圖五、日本及臺灣疑似淡色家蚊 PCR 結果圖·····	(15)
圖六、地下家蚊與熱帶家蚊 ACE-2 基因序列演化樹圖·····	(17)
圖七、地下家蚊 ACE-2 基因序演化樹·····	(18)
圖八、熱帶家蚊 ACE-2 基因序列演化樹·····	(19)
圖九、地下家蚊與熱帶家蚊 18S Ribosomal 基因序列 演化樹圖·····	(20)

表一、熱帶家蚊、地下家蚊及淡色家蚊之形態特徵·····	(8)
表二、尖音家蚊群分子生物鑑定蚊蟲種類之引子及其產物大小···	(11)
表三、蚊蟲吸血源PCR 鑑定所使用的試劑及劑量·····	(12)
表四、蚊蟲血源鑑定PCR所使用的引子及部分控溫條件·····	(12)
表五、101-102 年尖音家蚊群形態鑑定之樣本數及來源·····	(13)
表六、尖音家蚊群 363 隻分子鑑定結果·····	(15)
表七、利用 PCR 檢驗方法鑑定尖音家蚊群之吸血源·····	(21)
表八、樣本來源及其保存對 DNA 分析之影響·····	(21)

計畫中文摘要

此計畫為期三年，利用分子生物及型態鑑定進行台灣與日本病媒蚊與其傳播之病原基因關係。本年係比較台灣地區與日本淡色家蚊 *Cx. pipiens pallens*、熱帶家蚊 *Cx. quinquefasciatus* 及地下家蚊 *Cx. pipiens form molestus* 等尖音家蚊群基因序列，確認臺灣尖音家蚊群種類及其分布，並釐清入侵台灣地下家蚊之來源。經分子生物鑑定及基因序列分析，確認臺灣地區的尖音家蚊群包括熱帶家蚊及地下家蚊，無雜交現象，熱帶家蚊為優勢種，遍佈全台灣，吸血源有人及鳥，而地下家蚊發現於北部地場及各地機場或港口發現。經由 ACE-2 基因序列分析及飛機航班之採樣發現臺灣地區之地下家蚊入侵可能來自船或飛機帶入，基因交換十分頻繁。

關鍵詞：尖音家蚊群、基因序列分析、熱帶家蚊、地下家蚊、淡色家蚊、台灣、日本

計畫英文摘要：

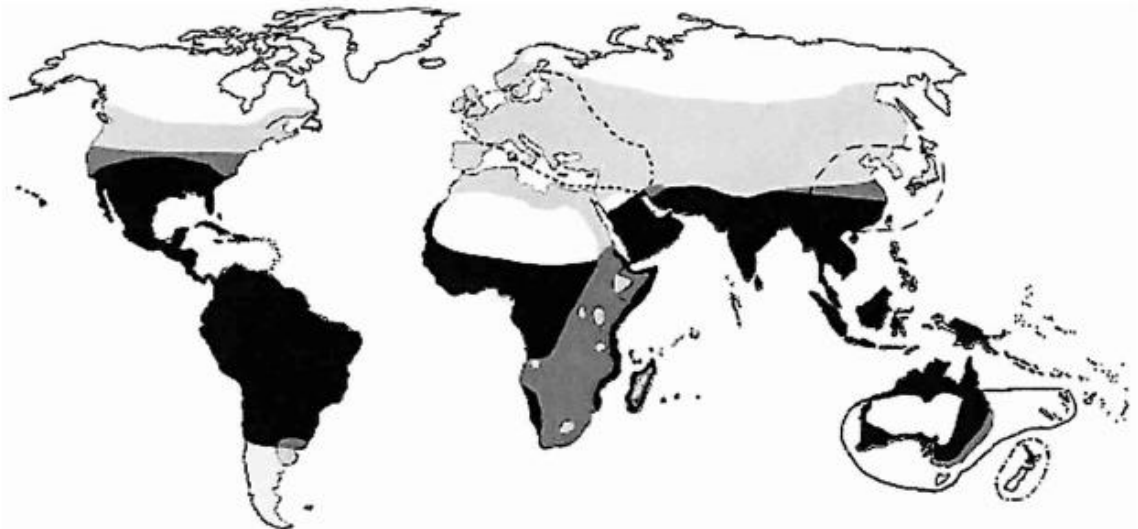
This is a three years project to study the genetic relationship of vector mosquitoes and its pathogens between Taiwan and Japan. The objective of this year is to study *Cx. quinifasciatus*, *Cx. pipiens pallens*, and *Cx. pipiens form molestus* by morphology and PCR methods to clarify the origin of invading species of *Cx. pipiens form molestus* and its distribution in Taiwan. Through molecular diagnosis and gene sequencing analysis, mosquito species of *Cx. pipiens* complex in Taiwan include *Cx. quiquefasciatus*, and *Cx. pipiens form molestus*. *Cx. quinifasciatus* is the predominant species, which distributes islandwide. The blooding resources include human and bird. *Cx. pipiens form molestus* distributes northern Taiwan as well as found in airports and harbors of other areas only. From gene sequencing analysis and mosquito collections in air plans, *Culex pipiens form molestus* may introduce from ships/airplanes and gene flow is frequent.

keywords : *Culex pipiens* complex, gene sequencing analysis, *Culex quinquasciatus*, *Culex pipiens form molestus*, *Culex pipiens pallens*, Taiwan, Japan

前言

台灣地區蚊蟲種類共有 132 種(Lien 2004)，其中尖音家蚊群(*Culex pipiens* complex)之部份種類為傳播西尼羅病毒、血絲蟲等重要病媒蚊。此群包括淡色家蚊(*Cx. pipiens pallens* Coquillett)、尖音家蚊(*Cx. pipiens* L.)、熱帶家蚊(*Cx. quinquefasciatus* Say)及 *Cx. australicus* Dobrotworsky & Drummond。台灣現有種類為熱帶家蚊及尖音家蚊地下型(地下家蚊 *Cx. pipiens* form *molestus*)，其中後者在 1996 年記載為外來入侵種。這些蚊蟲種類外部形態及棲所相似，容易造成混淆。因應新技術之發展，所以此群之分類地位及其分布可以分子生物學進一步探討，釐清入侵種之來源，以瞭解病媒性疾病傳播之途徑，提供病媒性疾病防治政策之參考。

尖音家蚊群(*Cx. pipiens* complex)為血絲蟲病及西尼羅病之主要病媒蚊(Turell et al. 2001, Kulasekera et al. 2000)，世界分布很廣，如圖一(Smith and Fonseca, 2004)。此群包括淡色家蚊(*Cx. pipiens pallens*)、尖音家蚊(含地下家蚊亞型 *Cx. pipiens* form *molestus* 及尖音家蚊亞型 *Cx. pipiens* form *pipiens*)、熱帶家蚊(*Cx. quinquefasciatus*)及 *Cx. australicus*，另外還有 2 種外部形態非常相似之姊妹種 *Cx. torrentium* Martini 及 *Cx. pervigilans* Von Bergroth。前者分布於歐洲及部份亞洲，後者分布於紐西蘭(圖一)。這些種類常利用外部形態 D/V 比例及 RCell/R2+3 比例來區分(Bekku 1956, Dehghan et al. 2011, Sanogo 2008)，這些種類之生態有所不同，其中尖音家蚊地下亞型第一次可不吸血產卵，尖音家蚊尖音亞型，則必需吸血方能產卵。Fonseca 等人(2004) 成功利用分子生物鑑定美國無所不在之尖音家蚊群是一群尖音家蚊及熱帶家蚊之雜交種，同時吸食人血及鳥血，可以當橋樑病媒，所以造成美洲之西尼羅病大流行，而歐洲之尖音家蚊群，則為獨立之族群，不混生。這些種類形態相似，再加上雜交種(hybrids)之存在，很容易造成分類混淆。因應新技術之發展，此群之分類地位可以分子生物學進一步釐清，可利用種類及亞型專一性之引子，來鑑定尖音家蚊群之種類(Smith and Fonseca 2004)、亞型(Bahnck and Fonseca 2006)及其分布(Diaz-Badillo 2011)。



圖一、尖音家蚊群及其姊妹種之世界分布圖。淡灰色：尖音家蚊分布區，黑色：熱帶家蚊分布區，深灰色：重疊區塊，點線區：*Cx. torrentium*，實線區塊：*Cx. australicus*，線狀區塊：淡色家蚊，點線區塊：*Cx. pervigilans* (摘自 Smith and Fonseca, 2004)。

台灣地區蚊蟲種類共有 132 種(Lien 2004)。病媒蚊可能藉由交通工具或貨物運輸入侵其他地區，例如白線斑蚊 *Aedes albopictus* 藉由廢輪胎於 1987 年入侵美國德

州 (Hawley et al. 1987)，隨後全美國，並富貴竹入侵加州南部(Madon et al. 2002)。台灣地區之尖音家蚊群有兩種，熱帶家蚊及地下家蚊，其幼蟲及成蚊特徵如表一。地下家蚊為外來種，在 1996 年被發現入侵台灣北部，北部在冬天亦能感受到蚊蟲之存在，其來源可能係由鄰近之溫帶國家-日本，所以可藉由比對蚊蟲基因來釐清。除病媒蚊外，病媒性病原亦可以藉由宿主帶入，例如西尼羅病毒入侵美國紐約，台灣地區之登革病毒。台灣地區日本腦炎病毒原為第三型，在 2008 年於關渡首度發現基因型第一型後(Huang et al. 2010)，各地區逐漸取代第三型。

材料與方法

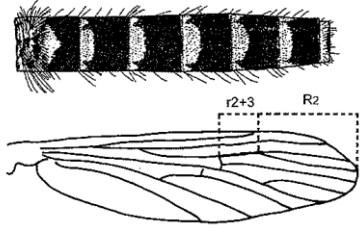
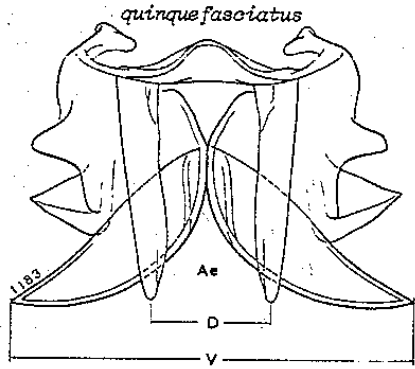
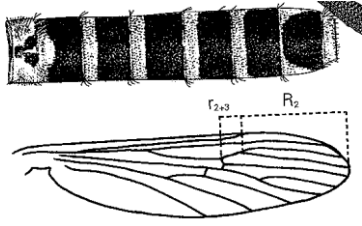
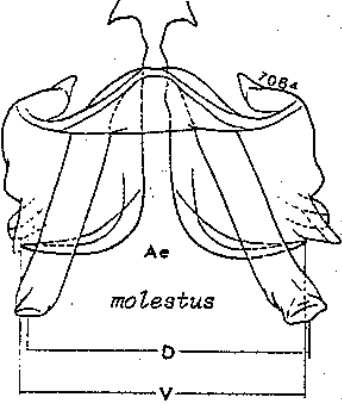
一、蚊蟲採集

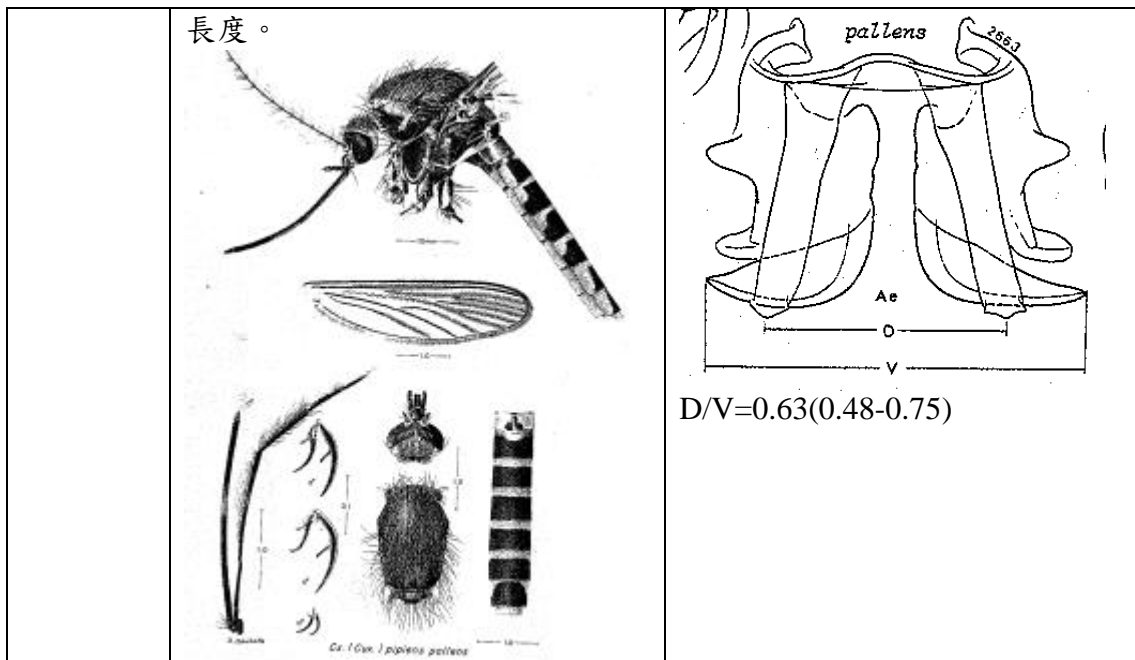
採集北部、中部、南部及東部住家採集熱帶家蚊及地下家蚊幼蚊及成蚊，帶回實驗室進行後續生態實驗、形態鑑定、分子生物鑑定及吸血源鑑定。另外蒐集或採集日本、菲律賓等臨近國家之尖音家蚊群，進行比對。

二、形態鑑定

以立體解剖顯微鏡進行外部形態鑑定(圖一及圖二)，包含雌蚊翅脈 II Cell/Stem x 100 及雄蚊生殖器 DV/D 值。

表一、熱帶家蚊、地下家蚊及淡色家蚊之形態特徵。

種類	成蟲外部形態特徵	雄蚊生殖器 DV/D 值
熱帶家蚊	<p>腹節 II-VII 背板基帶後緣凸起，和側斑分開；亞前緣脈貫穿前緣脈在徑脈 r_{2+3} 之前；徑分脈 r_{2+3} 約為前叉室 R_2 之三分之一長度。</p> 	 <p><i>quinquefasciatus</i></p> <p>D/V=0.29(0.22-0.35)</p>
地下家蚊	<p>腹節 II-VII 背板基帶後緣平齊或微凸或內凹，和側淡斑相連；亞前緣脈貫穿前緣脈在徑脈 r_{2+3} 或之後；徑分脈 r_{2+3} 約僅為前叉室 R_2 之五分之一長度。</p> 	 <p><i>molestus</i></p> <p>D/V=0.89(0.79-1.0)</p>
淡色家蚊	<p>腹節 II-VII 背板基帶後緣平齊或微凸或內凹，和側淡斑相連；徑分脈 r_{2+3} 約僅為前叉室 R_2 之四分之一</p>	



三、分子生物學鑑定

(一) 萃取蚊蟲 DNA

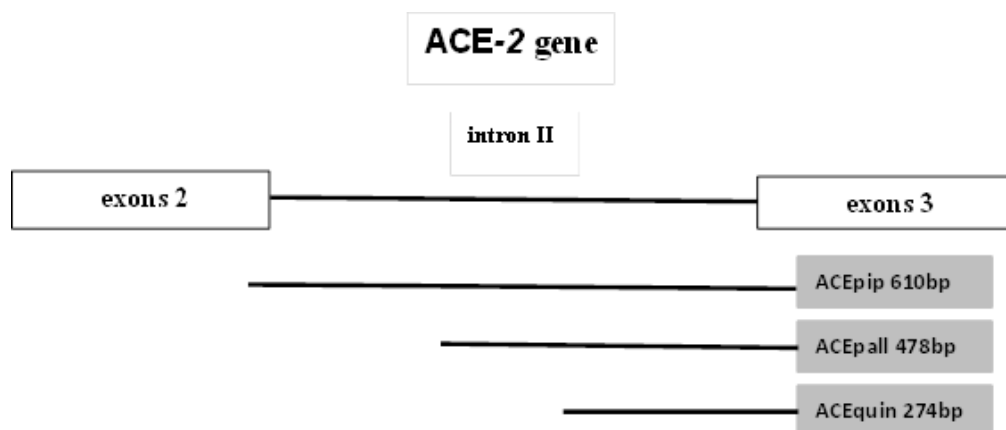
手動或機器萃取單隻蚊蟲 DNA，步驟說明如下：

1. 利用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)，手動萃取單隻蚊蟲 DNA 步驟如下：
 - (1) 將單隻蚊子放入 1.5 mL 微量試管中，加入 80 μ L PBS 溶液，並放入 1 顆滅菌過的玻璃珠。
 - (2) 以 Tissue lyser 震盪 2 分鐘打碎蚊蟲細胞組織(旋轉方向後再震盪 2 分鐘)。
 - (3) 加入 100 μ L Buffer ATL 溶液後，加入 20 μ L proteinase K，於 56 $^{\circ}$ C 中反應 over night。
 - (4) 利用離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。
 - (5) 加入 200 μ L Buffer AL 振盪 15 秒混合均勻，於 70 $^{\circ}$ C 中反應 10 分鐘
 - (6) 利用離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。
 - (7) 加入 200 μ L ethanol (96-100%)，振盪 15 秒混合均勻。
 - (8) 利用離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。
 - (9) 將溶液加入 QIAamp spin column，蓋上蓋子，以 8,000 rpm 轉速離心 1 分鐘，將 QIAamp spin column 放置新的 2 mL collection tube 上。
 - (10) 小心打開 QIAamp spin column 的蓋子，加入 500 μ L AW 1 溶液，蓋上蓋子，以 8,000rpm 轉速離心 1 分鐘，將 QIAamp spin column 放置新的 2ml collection tube 上。
 - (11) 小心打開 QIAamp spin column 的蓋子，加入 500 μ L AW 2 溶液，蓋上蓋子，以 14,000 rpm 轉速離心 1 分鐘。
 - (12) 將 QIAamp spin column 放置新的 1.5mL 微量離心管上，以 14000rpm 轉速離心 1 分鐘除去多餘的酒精。
 - (13) 將 QIAamp spin column 放置新的 1.5mL 微量離心管上，加入 70 μ L Buffer

- AE，靜置於室溫下 1 分鐘，以 8,000rpm 轉速離心 1 分鐘。
- (14)保存於 -80°C 。
- 2.利用機器抽取蚊蟲 DNA 步驟。
- (1)將 1 隻蚊子放入 1.5 mL 微量試管中，加入 200 μL MEM 溶液(GIBCO, Invitrogen)，並放入 1 顆滅菌過的玻璃珠。
 - (2)以 tissue lyser 震盪 2 分鐘打碎蚊蟲細胞組織(旋轉方向後再震盪 2 分鐘)。若為手動研磨，將研磨棒將上小型研磨機後，伸至微量離心管底部後，打開小型研磨機開關，研磨時間約 2 分鐘或至研磨均勻為止。
 - (3)加入 500 μL MEM 溶液後，上下倒置數次混合均勻。
 - (4)將均質液以 10,000rpm 離心 10 分鐘除去懸浮固體。
 - (5)利用自動核酸萃取儀(MagNA Pure 96, Roche)進行病媒蚊 DNA 萃取，使用之 KIT 為 MagPure 96 DNA and Viral NA volume kit (Roche)，使用步驟如下：
 - a.取 200 μL 步驟 4.的上清液放置於 processing cartridge 中。
 - b.開機後點選桌面上 MagNAPure96 軟體圖示。
 - c.點選軟體右方區域，Logon 選項，輸入帳號及密碼。
 - d.點選” Enter Order” ，進入編輯頁面。
 - e.點選使用 KIT 名稱(DNA/Viral NA SV 1.0)及純化步驟名稱(DNA Cells SV 0.7.2)。
 - f.點選樣品體積 200 μL 及純化後體積 100 μL 後儲存設定。
 - g.點選 96 孔盤圖示，依序輸入樣品名稱。
 - h.依照圖示，將所需要的試劑及耗材依序放入圖示位置，關上機門，機器會掃描確定耗材位置是否正確。
 - i.點選開始鍵，開始進行實驗。

(二)蚊蟲種類鑑定聚合酶連鎖反應(PCR)

萃取出 DNA 樣本直接利用 realtime PCR machine(LightCycler 480 II, Roche)進行實驗。使用之引子(圖二及表二)及放大溫度程式參考 Smith and Fonseca (2004)及 Bahnck and Fonseca (2006)，如下表。放大參考溫度程式為 1 cycle (94°C 5 min)，35 cycles (94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 60 sec)，1 cycle (72°C 5 min)，但仍需要找到最佳狀況。



圖二、ACE-2 基因序列 PCR 產物圖。

表二、尖音家蚊群分子生物鑑定蚊蟲種類之引子及其產物大小。

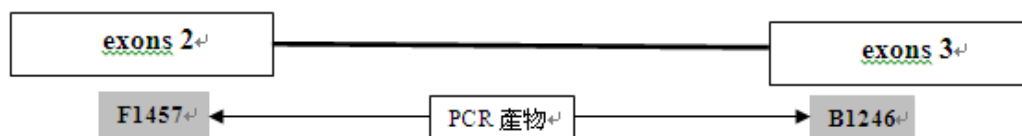
引子 Primers	引子序列 Primer sequence	蚊蟲種類	PCR 產物
ACEquin	5'-CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3'	<i>Culex quinquefasciatus</i>	274 bp
ACEpall	5'-ATGGTGGAGACGCATGACG-3'	<i>Culex pipiens pallens</i>	478 bp
ACEpip	5'-GGAAACAACGACGTATGTACT-3'	<i>Culex pipiens</i>	610 bp
B1246s	5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGG-3'	Forward primer	

(三)電泳跑膠比對產物大小，並將產物定序後，進入資料庫比對，確認蚊蟲種類。

四、基因定序分析

使用F1457(5'-GAGGAGATGTGGAATCCCAA-3')及B1246(5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGGC-3')引子 (Smith and Fonseca, 2004), 針對ace-2基因的exon2,exon3部份區域及完整的intron II 區域(圖三)，進行PCR反應，經膠體電泳確認結果，再經定序取得DNA序列，進行演化樹分析。尖音家蚊群挑選形態外觀較完整的樣本(363隻蚊蟲)進行ace-2基因PCR反應，其中有PCR結果產出的樣本有221個，反應率60.9%。所有檢體完成定序後共取得164筆尖音家蚊群DNA序列，並在NCBI資料庫上下載13筆國外已發表蚊蟲序列，而後進行多重序列排序,並以此排序結果用MEGA軟體5.2版本 (<http://www.megasoftware.net/>) 先進行親緣關係樹的模式分析(Model test)。由分析結果可知，最適合的模式是Kimura 2 Parameter (K2P)，而後在進行演化樹分析時,選擇此參數。

AEC-2 gene



圖三、ACE-2 基因序列定序(bp)分析區域圖。

五、吸血源分析鑑定方法

本計畫使用的吸血源鑑定分析方法採用 PCR 方法(Chang et al. 2008)，並將PCR產物送定序，定序結果上資料庫比對。

(一)粹取 DNA: 使用 QLAamp DNA Mini Kit

1. 將蚊子至於 1.5mL 離心管中，加入 100 μ L 無菌水研磨，取 50 μ L 研磨液加入 ATL 緩衝液。
2. 加入 Proteinase K 20 μ L，利用震盪器充分混合之後，乾浴至 56 $^{\circ}$ C 1 小時使研磨液完全溶解(完全溶解時間大約 1-3 小時，視組織不同而定)，期間不定時震盪。
3. 稍微離心後加入 AL 緩衝液 200 μ L，震盪 15 秒之後放置 70 $^{\circ}$ C (乾浴) 10 分鐘。

4. 稍微離心後加入 96-100% ethanol 200 μ l，震盪 15 秒。
5. 將步驟 4 之產物 注入 QIAamp apin column，離心 8000 rpm，1 分鐘。
6. 加入 500 μ L 之 WA1 buffer 至步驟 5 之 column，離心 8000 rpm，1 分鐘。
7. 加入 500 μ L 之 WA2 buffer 至步驟 6 之 column，離心 14000 rpm，3 分鐘。
8. 將步驟 7 之 column 再離心 14000 rpm，1 分鐘。
9. 加入 100 μ L AE buffer 並置於室溫 1 分鐘。
10. 離心 8000 rpm 1 分鐘 收取液體保存後續 PCR 使用。

(二) 吸血源分析聚合酶連鎖反應 PCR

PCR 使用的試劑及劑量如表二。PCR 所選用的 primers 參考 Parodit *et al.* (2002), Rebekah *et al.* (2003) 及 Lahiff *et al.* (2001) 等發表的文章。而控溫程式為 94°C 2 min ; (94°C 30 sec ; 50-52°C 30 sec ; 72°C 60 sec) 35 循環 ; 72°C 20 min ; 4°C (表四)。

表三、蚊蟲吸血源 PCR 鑑定所使用的試劑及劑量。

試劑項目	體積
5X PCR Master Mix	10 μ l
Primer-R(10 μ M)	0.5 μ l
Primer-F (10 μ M)	0.5 μ l
DNA product	1.0 μ l
Distilled water	37 μ l
合計	50.0 μ l

表四、蚊蟲血源鑑定 PCR 所使用的引子及部分控溫條件。

動物種類	Primers		PCR 的程式中 PCR 產物	
	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Annealing 溫度	
鳥	GACTGTGACAA AATCCCNTTCCA	GGTCTTCATCTYHG GYTTACAAGAC	50 °C	508bp
哺乳動物	CGAAGCTTGATA TGAAAAACCATC GTTG	TGTAGTTRTCWGGG TCIICCTA	52 °C	772bp

六、自體產卵行為之生態實驗

將北部、中部、南部及東部都會區採集之尖音家蚊群幼蚊或蛹，帶回實驗室飼養，在常溫下，觀察自體產卵(autogenous)行為至天，最後將成蚊蟲凍死後抽樣進行形態及分子生物鑑定。

結果

一、蚊蟲採集及形態鑑定

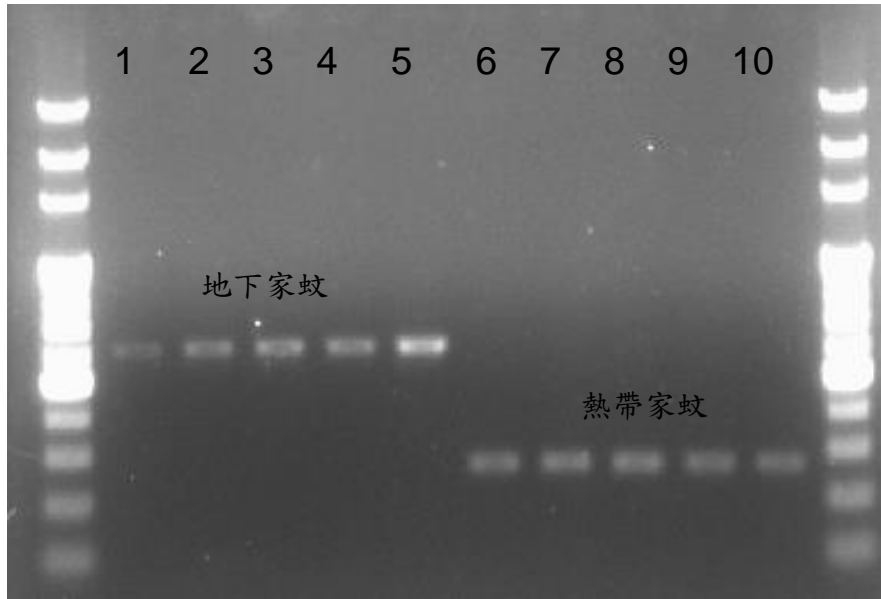
本計畫樣本來源包括 101 年及 102 年矮小瘧蚊調查、港阜蚊蟲監測計畫、日本腦炎調查、國外收集及生態實驗，蚊蟲經外部形態(雌蚊翅脈 II Cell/Stem x 100 及雄蚊生殖器 DV/D 值)鑑定之尖音家蚊群蚊蟲共 711,960 隻，其中包括臺灣地區熱帶家蚊 70,966 隻，地下家蚊 105 隻、飛機航班 37 隻、菲律賓熱帶家蚊 34 隻、日本 NIID 提供的熱帶家蚊 19 隻、地下家蚊 17 隻及淡色家蚊 18 隻。

表五、101-102 年尖音家蚊群形態鑑定之樣本數及來源。

採集時間	來源	縣市	熱帶家蚊	地下家蚊	淡色家蚊
2013	日本腦炎調查	台北市	1	12	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	宜蘭縣	613	8	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	新北市	1,767	33	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	桃園縣	773	3	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	新竹縣	2,161	2	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	桃園機場	1,780	3	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	蘇澳港	210	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	基隆港	119	6	0
2013/08	生態實驗	台北市	5	0	0
2013	日本腦炎調查	台中縣	1	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	台中港	1,443	5	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	台中機場	189	6	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	雲林縣	1,107	0	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	南投縣	232	0	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	嘉義縣	76	0	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	台南市	3,471	1	0
2013/08	生態實驗	台南市	37	0	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	高雄市	1,056	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	高雄機場	20,717	11	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	高雄港	33,874	15	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	花蓮縣	381	0	0
2012-13	矮小瘧蚊調查	台東縣	397	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	金門水頭港	16	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	金門料羅港	30	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	馬祖福澳港	298	0	0
2012-13	港阜蚊蟲監測	澎湖馬公港	212	0	0
2012-13	總計	臺灣	70,966	105	0
2013	飛機航班	東南亞地區	37	0	0
2012-13	國外收集樣本	菲律賓	34	0	0
2013	國外收集樣本	日本	19	17	18
2012-13	總計		71,074	122	18

二、蚊蟲分子生物學鑑定

首先，利用 3 段不同長度的 PCR 產物，偵測 3 種尖音家蚊 *Culex pipiens* complex [*Cx. pipiens* (610bp)、熱帶家蚊 *Cx. quinquefasciatus* (274bp)、淡色家蚊 *Cx. piens pallens* (478bp) 及其雜交種 (hybrids)，為了蚊蟲分子生物學鑑定順利進行，故於本實驗室之養蚊室隨機選取各五隻熱帶家蚊以及地下家蚊，抽其 DNA 並進行 PCR 反應，確認方法之可行性(圖四)。

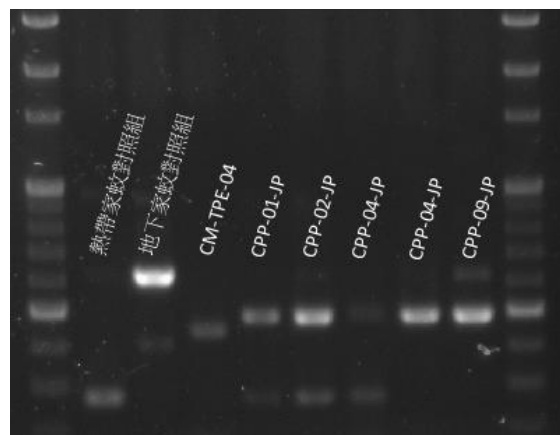


圖四、Lane1~5 為地下家蚊檢體(610 bp)，lane 6~10 為熱帶家蚊檢體(274 bp)。

共鑑定 363 隻蚊蟲，熱帶家蚊 106 隻、地下家蚊 38 隻、淡色家蚊 2 隻、雜交種 4 隻，未分類 213 隻(表六)，鑑定率為 41.3%。熱帶家蚊形態鑑定率為 99.1%(106/107)，其中錯誤鑑定為地下家蚊 1 隻，地下家蚊形態鑑定率為 97.4%(37/38)，其中錯誤鑑定為淡色家蚊 1 隻。臺灣地區地下家蚊檢出之來源樣本為宜蘭縣 3 隻、基隆港 4 隻、新北市 10 隻、台北市 2 隻、桃園機場 3 隻、台中機場 4 隻、台中港 1 隻、台南市 1 隻、高雄港 3 隻及高雄機場 3 隻。雜交種僅發現於日本所提供的淡色家蚊出現雜交種結果，CPP-01-JP，CPP-02-JP 及 CPP-04-JP 為淡色家蚊/熱帶家蚊雜交種，CPP-09-JP 為淡色家蚊/地下家蚊雜交種，如圖四。另外，採集自臺北原形態鑑定為地下家蚊的 CM-TPE-04 疑似為淡色家蚊，但經再跑膠後排除。

表六、尖音家蚊群 363 隻分子鑑定結果。

國家	蚊蟲種類	熱帶家蚊	地下家蚊	淡色家蚊	雜交種	未分類	合計
臺灣	熱帶家蚊	79	1	0	0	123	203
	地下家蚊	0	34	0	0	49	83
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
越南	熱帶家蚊	1	0	0	0	1	2
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
泰國	熱帶家蚊	2	0	0	0	8	10
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
柬埔寨	熱帶家蚊	6	0	0	0	11	17
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
緬甸	熱帶家蚊	1	0	0	0	1	2
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
新加坡	熱帶家蚊	1	0	0	0	0	1
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
菲律賓	熱帶家蚊	12	0	0	0	3	15
	地下家蚊	0	0	0	0	0	0
	淡色家蚊	0	0	0	0	0	0
日本	熱帶家蚊	4	0	0	0	6	10
	地下家蚊	0	3	0	0	7	10
	淡色家蚊	0	0	1	4	5	10
合計	熱帶家蚊	106	1	0	0	153	260
	地下家蚊	0	37	0	0	56	93
	淡色家蚊	0	0	1	4	5	10
	總計	106	38	1	4	214	363



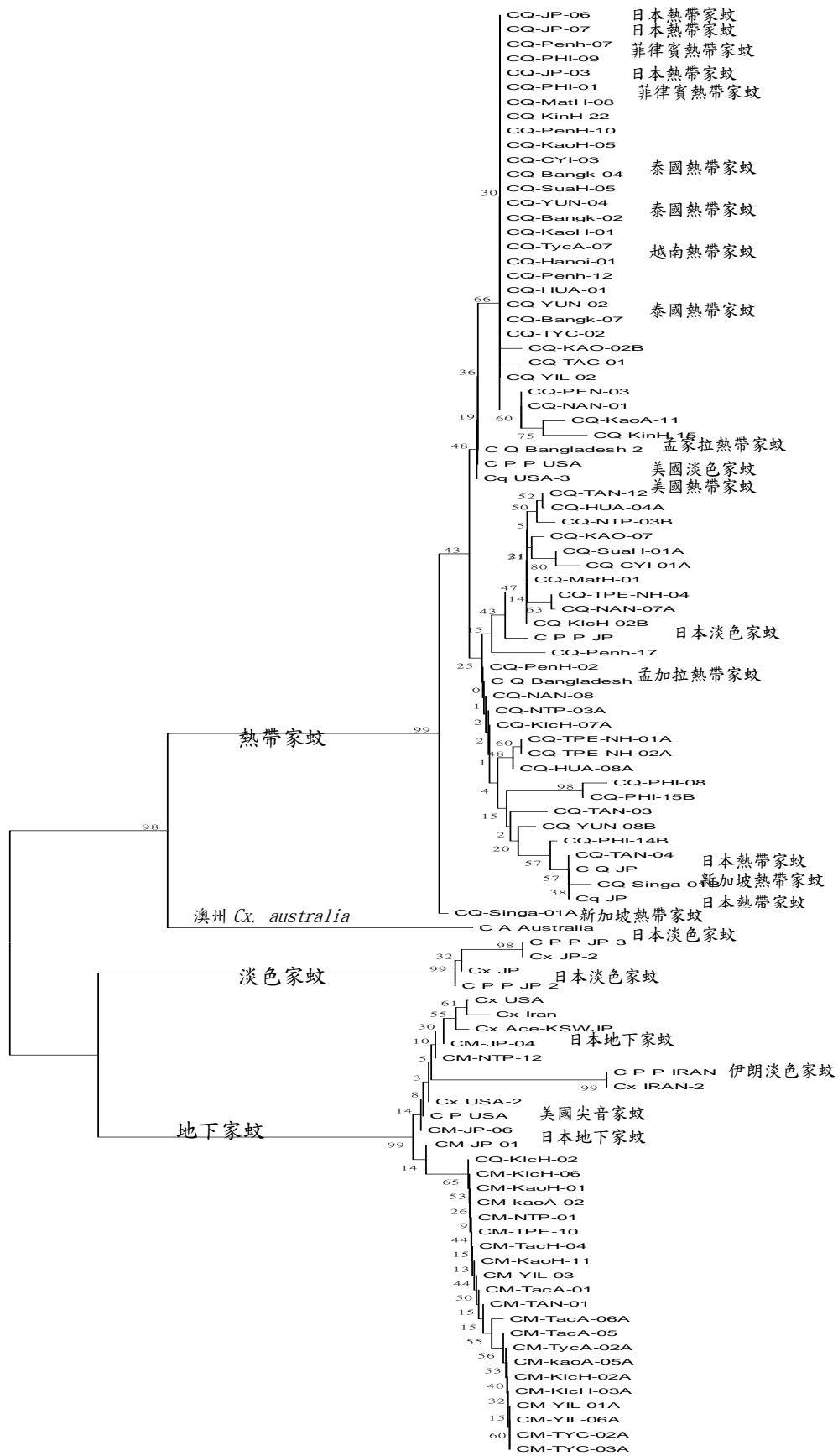
圖五、日本及臺灣疑似淡色家蚊 PCR 結果圖。

三、蚊蟲基因定序

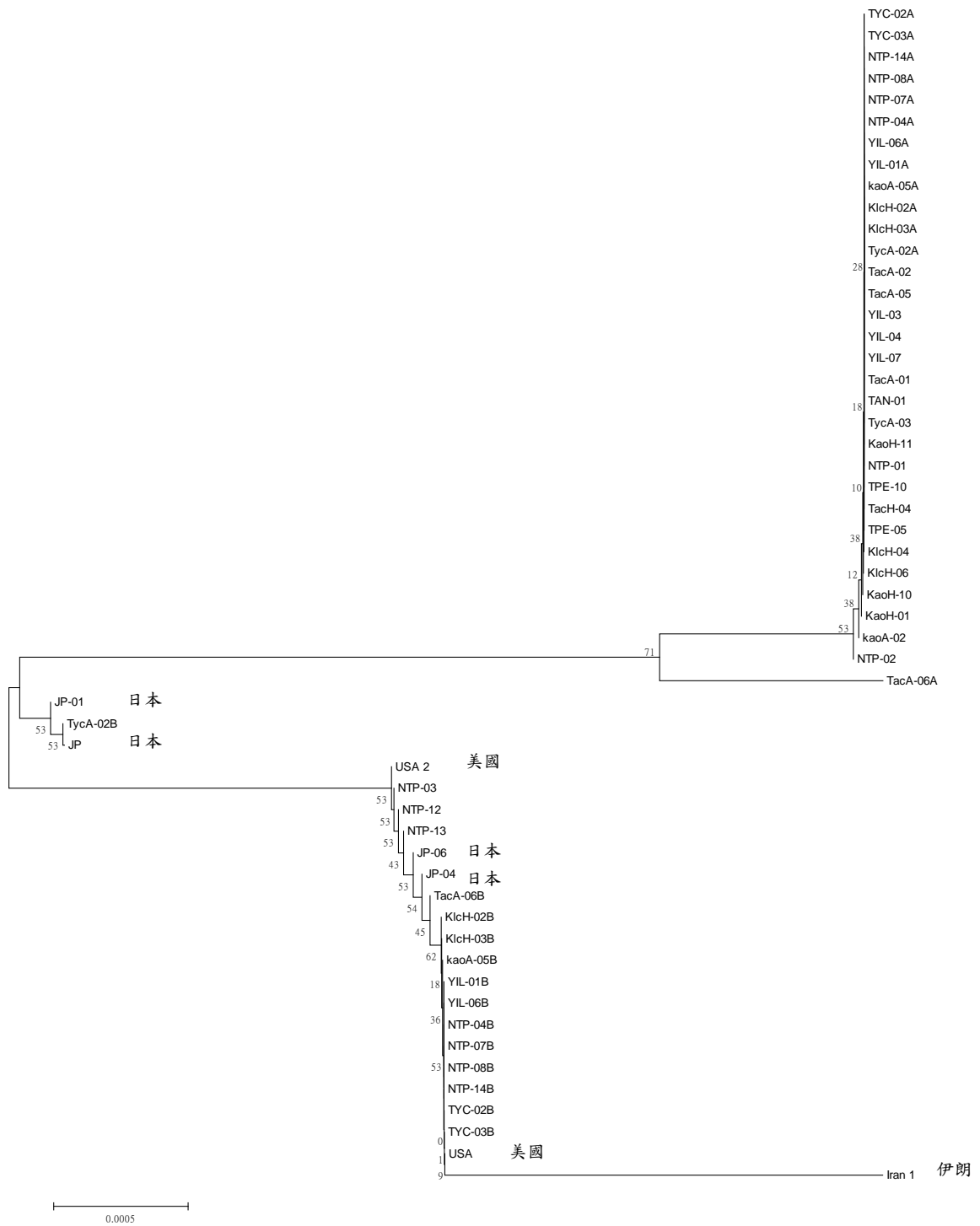
ACE-2 基因 PCR 反應成功，送定序共 221 隻樣本，包括熱帶家蚊 110 隻，地下家蚊 57 隻，國外樣本 37 隻，國際航班 17 隻。得到可用定序結果，共 146 隻樣本(177 條)，熱帶家蚊 64 隻(81 條)，地下家蚊 39 隻(50 條)，國外樣本 32 隻(31 條)，國際航班 11 隻(13 條)。我們將部份地下家蚊與熱帶家蚊以及淡色家蚊序列進行親緣關係分析(圖六)，此分析中，我們使用了 Neighbor joining (NJ) 這個演算法，並以 bootstrap 方法運算 1000 次以取得其樹型統計值。在 NJ 分析得到的結果可將地下家蚊以及熱帶家蚊分為兩大族群，而淡色家蚊另獨立形成一群，並且有統計值上的支持，證實此實驗分析的確可有效區分地下家蚊與熱帶家蚊，但為易於辨識，僅選擇部份序列表示，其中一個地下家蚊檢體形態鑑定為熱帶家蚊 CQKc1H-02。

為了研究台灣地下家蚊的可能來源地區，我們另外單獨分析地下家蚊序列，從 NCBI 資料庫下載其他國家的地下家蚊序列後，進行多重序列排序(Multiple Sequence Alignment)。隨後以 MEGA 進行親緣關係樹的模式分析，其結果顯示最適合的模式為 Kimura 2 Parameter (K2P)，之後在進行演化樹分析時，選擇此參數。此分析以 Neighbor joining 方法進行演化樹建構，並進行 1000 次的 bootstrap value 分析。從結果可知，這些分析的序列有潛力分為兩大族群(bootstrap value: 71)。其中一族群的地下家蚊皆來自台灣本地，包括基隆、雙北市、宜蘭、桃園、台中、高雄。雖然這些序列被分為同一族群，但依舊無法以地理位置進行更細部的分類(此族群內 bootstrap value 最高為 53)(圖七)。而另一結果顯示，在台灣取得的地下家蚊序列會與其他國家的地下家蚊序列形成同一族群，這些國家包括美國、日本、伊朗，而被分在此族群的台灣地下家蚊序列則是來自基隆、新北市、宜蘭、桃園、台中、高雄等地，而此族群的結果亦顯示這些序列無法依地理位置在進行分群。另一方面，在此演化樹圖中可以看到有一來自桃園機場的地下家蚊序列(TycA-02B)與兩條來自日本的序列形成一小族群，不過統計值僅有 53，若是可以取得其他更多檢體或許有機會可以得到較穩固的演化樹圖形。

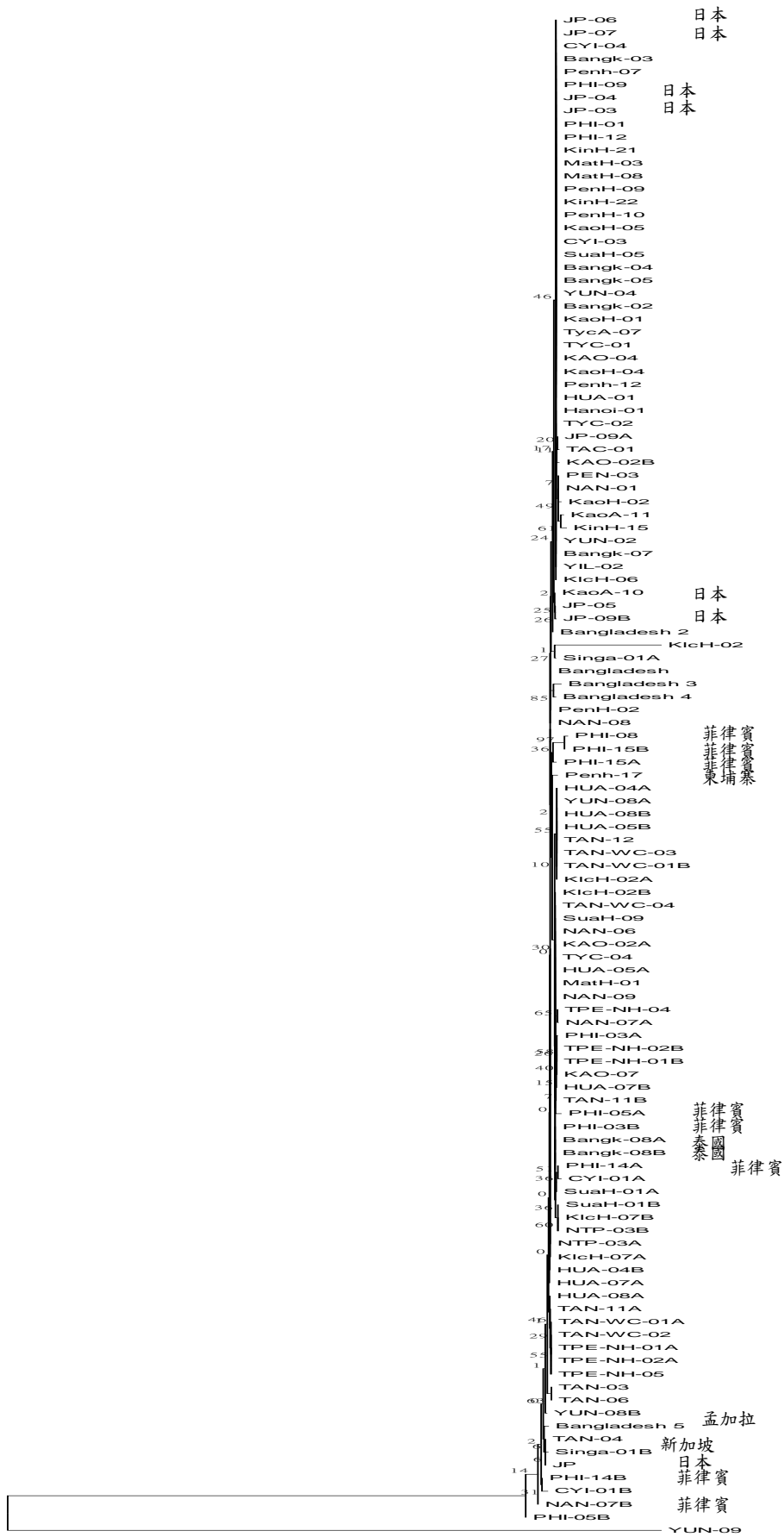
在單獨分析完地下家蚊的親緣關係圖譜後，我們亦單獨分析熱帶家蚊序列建構其親緣關係樹，同樣以 NJ 這個演算法建構且計算 1000 次 bootstrap value。由分析結果可知，如同之前分析，大多數的序列皆無法依其地理來源做有效分類，僅有兩條來自孟加拉(Bangladesh 3、bangladesh 4)，以及兩條來自菲律賓的序列(PHP08、PHP15B)可獨立形成兩個小族群，其他序列一樣會與其他地區來源的蚊子序列排在一起(圖八)。



圖六、尖音家蚊群 ACE-2 基因片段序列演化樹圖：CQ/Cq-熱帶家蚊，CM-地下家蚊，CP-尖音家蚊，CPP-淡色家蚊，Cx-家蚊屬。



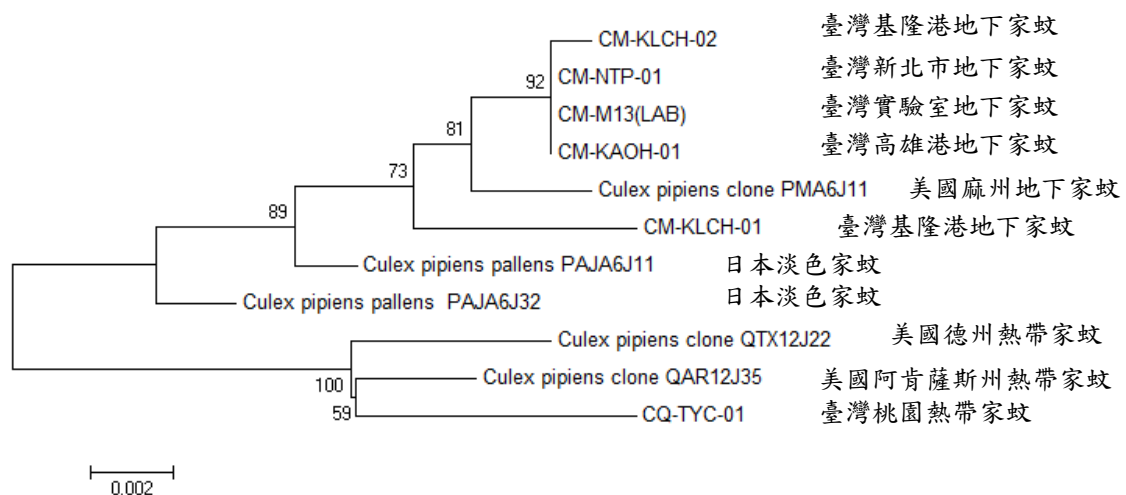
圖七、地下家蚊 ACE-2 基因片段序列演化樹圖((YIL-宜蘭、KlcH-基隆港、NTP-新北市、TPE-台北市、TycA-桃園機場、TYC-桃園縣、TacA-台中機場、Tach-台中港、KaoH-高雄港、KaoA-高雄機場)。



圖八、熱帶家蚊 ACE-2 基因片段序列演化樹圖(YIL-宜蘭、SuaH-蘇澳港、KicH-

基隆港、NTP-新北市、TPE-台北市、TPE-NH-台北內湖、TycA-桃園機場、TYC-桃園縣、TAC-台中縣、TAcA-台中機場、TAcH-台中港、NAN-南投縣、YUN-雲林縣、CYI-嘉義縣、TAN 台南市、TAN-WC 台南安南、KAO-高雄市、KaoH-高雄港、KaoA-高雄機場、HUA-花蓮縣、KinH-金門、MatH-馬祖、PenH-澎湖馬公港、PEN-澎湖縣、Phi-菲律賓、JP-日本、Hanoi-越南河內、Bangk-泰國曼谷、Penh-柬埔寨金邊、Singa-新加坡、Bangladesh-孟加拉)。

另以 18S ribosomal DNA(1,120 bp)作為親緣關係樹分析目標，選擇 5 個地下家蚊及 1 個熱帶家蚊樣本重新分析，進入 NCBI 資料庫比對，臺灣地區之地下家蚊與美國麻州地下家蚊 *Culex pipiens* clone PMA6J11 最為相近，相似度 97%，熱帶家蚊則與美國德州及阿肯薩斯州之熱帶家蚊相似(圖九)。



圖九、尖音家蚊群 18S ribosomal 基因片段序列演化樹圖。

另外實驗發現可能的樣本污染情形，雲林的 CQ-YUN-07 及 CQ-YUN-09 定序分析結果出現細菌的序列，*Bradyrhizobiaceae bacterium*，相似度 99%，推測為樣本被土壤中的細菌污染造成。

四、吸血源分析鑑定

共收集到 90 隻吸血之蚊蟲，其中地下家蚊 3 隻，熱帶家蚊 87 隻。經吸血源 PCR 分析，得到 18 隻蚊蟲有 PCR 反應結果，經送定序確認，得到 10 隻之吸血源為人類，分別來自菲律賓 1 隻，飛機航班 4 隻，花蓮 1 隻，台東 2 隻，高雄 1 隻及臺南 1 隻，吸血源為灰背伯勞鳥 1 隻來自桃園機場。另 7 個樣本因訊號強度過低，雜訊過高無法判別，檢出率為 12.2%。推測係因蚊蟲採集方法及保存之影響，宿主血液中的 DNA 被蚊蟲腸道中的酵素所分解。

表七、利用 PCR 檢驗方法鑑定尖音家蚊群之吸血源。

蚊蟲種類	檢驗蚊蟲數(n)	陽性蚊蟲數(n)	吸血源種類
熱帶家蚊	87	10	<i>Homo sapiens</i> (人類)
		1	<i>Lanius tephronotus</i> (灰背伯勞鳥)
地下家蚊	3	0	
總計	90	11	

五、自體產卵行為生態實驗

檢視北部(臺北市內湖區 39 隻)、中部(台中市東勢區 16 隻)、南部(臺南市中西區 35 隻)及東部(花蓮市 34 隻)之尖音家蚊群，尚未發現有自體產卵行為，並經形態及分生鑑定為熱帶家蚊。

六、樣本來源及其保存對 DNA 分析之影響

此計畫蒐集之樣本來源及其後續保存對 DNA 後續分析的結果如表八。分子生物鑑定率平均為 41.0%，介於 31.8-100.0%，基因定序的 PCR 完成數平均為 60.9%，介於 46.4-90.9%。可知道新鮮樣本、乾冰運送等對 DNA 保存較佳。

表八、樣本來源及其保存對 DNA 分析之影響。

蚊蟲來源	樣本狀態 (來源)	蚊蟲 總數	分生鑑定		基因序列分析				
			隻數	%	PCR 數	%	定序 隻數	%	條 數
實驗室品系		10	10	100.0	-	-	-	-	-
生態實驗	新鮮樣本	11	9	81.8	10	90.9	8	80.0	11
菲律賓掛燈 採集	乾冰運送， -80°C 保存	15	12	80.0	13	86.7	8	61.5	12
矮小瘧蚊掛 燈夜採	常溫運送， -20°C 保存	115	55	47.8	82	71.3	53	64.6	72
日本	乾燥/低溫	30	12	40.0	24	80.0	18	75.0	19
港阜調查 (飛機航班)	常溫運送， -80°C 保存	30	12	34.4	24	53.1	11	64.7	13
港阜蚊蟲	常溫運送， -80°C 保存	151	48	31.8	70	46.4	41	58.6	49
日腦		9	2	22.2	5	55.6	1	20.0	1
	總計	363	149	41.0	221	60.9	140		

討論

臺灣地區之尖音家蚊群種類包括熱帶家蚊及地下家蚊，熱帶家蚊為優勢種，遍佈全國各採樣點，可吸人血及鳥血，而地下家蚊分布於北部採樣點及各地港阜及機場。利用 ACE-2 基因片段定序，發現臺灣地區的地下家蚊與其他國家無法區分，基因交流頻繁，由東南亞飛機航班經常捕獲熱帶家蚊來看，由港阜進入臺灣之可能性極高。

尖音家蚊群種類中，臺灣首度記錄於臺北捕獲疑似淡色家蚊一隻，雖無法由

基因定序證實，但由東南亞航班，常可捕獲熱帶家蚊，可知尖音家蚊群為夜行性蚊蟲，極易透過光的吸引進入飛機航班或貨輪，轉至世界各地。紐西蘭曾於2001年9月20日在一座停放於Auckland港口來自日本經過香港之船上甲板捕獲1隻淡色家蚊雄蚊，並多次於港口或機場捕獲熱帶家蚊，但因熱帶家蚊為當地種，而無法確定其來源(Entomology laboratory, 2007)。目前松山機場及中正機場都有直航班機來自淡色家蚊之國家，如在中國大陸淡色家蚊是常見蚊種，並為西尼羅病毒與班氏絲蟲的病媒之一，所以應持續監控入侵蚊蟲種類，降低西尼羅病毒或班氏絲蟲入侵的風險，並視需要進行機艙及船艙的噴藥防蚊措施(Gratz et al. 2000)。

此研究顯示臺灣地區尖音家蚊群無雜交現象，僅收集自日本淡色家蚊有80%雜交現象，再度證實淡色家蚊是一個雜交族群(Barr 1982, Miller et al. 1996)，非亞種(Tabachnick & Powell 1983)。利用ACE-2基因片段序列來釐清地下家蚊之來源，雖然分成3群，但無地域性，而可能原因為我們所使用的序列無法提供足夠訊息，也有可能是蚊蟲基因交流頻繁，隨時自其他國家帶入臺灣或自臺灣帶出，以致無法區分，由熱帶家蚊親源演化樹圖可見。另外值得注意的是臺灣於1996年發現地下家蚊，目前逐漸自我形成一個亞群，而桃園機場的個樣本，則與日本2條序列成單一亞群，所以若有更多的樣本應可更明朗化。

本研究熱帶家蚊外部形態鑑定率為99.1%，地下家蚊形態鑑定率為97.4%，分子生物鑑定率為41.3%。尖音家蚊群外部形態，極其相似，不易區分，但具有豐富鑑定經驗的專業人員仍可保持高鑑定率。本研究的低分子生物鑑定率係因樣本的保存狀態，由我們鑑定出的土壤細菌可知，而在野外採集的昆蟲檢體保存與運送會影響DNA的降解速度，一般昆蟲保存方法可用低溫保存(-70°C)、直接乾燥(pinning)、將檢體保存在緩衝液或化學溶液(如丙酮、酒精)。而有研究指出將檢體以乾冰、silica gel、丙酮保存可穩定檢體DNA，若是保存在室溫的環境則會使檢體DNA無法有效保存而逐漸降解(Moreira et al. 2013, Salgado et al. 2007)。因此，此分子實驗鑑定率偏低可能與檢體運送與保存有關，故需進一步釐清採樣的方法及其後送實驗室的保存方法。

結論與建議

- 一、經分子生物鑑定及基因序列分析，確認臺灣地區的尖音家蚊群包括熱帶家蚊及地下家蚊，熱帶家蚊為優勢種，遍佈全臺灣，吸血源有人及鳥，而地下家蚊地下家蚊分布於北部採樣點及各地港阜及機場。
- 二、尖音家蚊群仍可賴有經驗的分類人員進行形態鑑定，但對有疑問之檢體，可進行分子生物鑑定，並經基因定序確認。
- 三、利用ACE-2基因片段定序，發現臺灣地區的地下家蚊與其他國家無法區分，基因交流頻繁，由東南亞飛機航班經常捕獲熱帶家蚊來看，由港阜進入臺灣之可能性極高，建議持續進行港阜掛燈及航班採樣，進行基因序列分析，監測淡色家蚊之入侵，並視需要進行機艙及船艙的噴藥防蚊措施。
- 四、港阜及機場應有防蚊設計，並定期執行防蚊措施。

重要研究成果及具體建議

臺灣地區的尖音家蚊群包括熱帶家蚊及地下家蚊，熱帶家蚊為優勢種，遍佈全臺灣，吸血源有人及鳥，而地下家蚊侷限分布於北部採樣點及各地港阜及機場，建議持續進行港阜掛燈及航班採樣，進行基因序列分析，監測淡色家蚊之入侵，並視需要進行機艙及船艙的噴藥防蚊措施。

參考文獻

- Bahnck CM, and Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *Am. J. Trop. Hyg.* 2006, 75(2):251-255.
- Barr, AR. 1982. The *Culex pipiens* complex. Recent developments in the genetics of insect disease vectors (Steiner, WWM, Tabachnick, WJ, Rai, S, and Narang KS, eds), pp. 551-572. Stipes Press, Champaign, III.
- Bekku H. Studies on the *Culex pipiens* group of Japan: I. comparative studies on the morphology of those obtained from various localities in the Far East. *Nagasaki Med. J.* 1956, 31: 956-966.
- Chang MC, Teng HJ, Chen CF, Chen YC and Jeng CR. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria J.* 2008, 7:105.
- Dehghan H, Sadraei J, Moosa-Kazemi SH. The morphological variations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in central Iran. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 2011 :215-219
- Diaz-Badillo A, Bolling BG, Perez-Ramirez G, Moore CG, Martinez-Munoz JP, Padilla-Viveros AA, Camacho-Nuez M, Diaz-Perez A, Beaty BJ and de Lourdes Munoz M. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasi. Vec.* 2011, 4:70.
- Entomology Laboratory. *Culex pipiens* complex. New Zealand Biosecure, a Division of SMS southern Monitoring Services, 2007. 7 pp.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wikerson RC. Emerging vectors in the *culex pipiens* complex. *Science* 2004, 303:1535-1538.
- Gratz NG, Steffen R, Cocksedge W. Why aircraft disinsection? *Bull. World Health Org.* 78:995-1004.
- Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB, Craig GB, Jr. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 1987, 236: 114-1116.
- Huang JH, Lin TH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Lu LC, Lin C, Yang CF, Chang SF, Liao TL, Yu SK, Cheng CH, Chang MC, Hu HC, Shu PY. Molecular Epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, 16: 876-878.
- Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, Glaser C, Miller JR, West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, 7: 722-725.
- Lien JC. Pictorial keys to the mosquitoes of Taiwan. Yi Hsien Publishing Co., Ltd. 2004, 178 pp.
- Madon MB, Mulla MS, Shaw MW, Kluh S, Hazelrigg JE. Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in Southern California and potential for its establishment. *J. Vec. Eco.* 2002, 27: 149-154.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol. Bio.* 1996, 5: 93-107.
- Moreira AS., Horgan FG., Murray TE, KAKOULI-DUARTE T. Bumblebee (Hymenoptera: Apidae) sample storage for a posteriori molecular studies: Interactions between sample storage and DNA-extraction techniques. *Eur. J. Entomol.* 2013, 110(3): 419-425,

- Salgado A, Vieiralves T, Lamarão FRM, Assumpção LLM, Gomes D, Jascione L, Valadão AL, Albano RM, Lôbo-Hajdu G. Field preservation and optimization of a DNA extraction method for Porifera. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability* 2007, 555-560.
- Sanogo YO, Kim CH, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ. Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques. *J. Med. Entomol.* 2008, 45:203-209.
- Smith JL and Fonseca DM. Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004, 70:339-345.
- Tabachnick, WJ and Powell JR. Genetic analysis of *Culex pipiens* populations in the Central Valley of California. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1983, 76: 715-720.
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW. Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 2001, 38: 130-134.