

計畫編號: MOHW111-CDC-C-315-133112

衛生福利部疾病管制署 111 年署內科技研究計畫

計畫名稱：臺灣病媒性病原之監測及特性分析

111 年 度 研 究 報 告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸

協同主持人：鄧華真、張淑芬、陳秀玲

研究人員：蘇千玲、楊正芬、張梅君、楊凱蓉、胡懷菁、楊

素鈴、鍾瀚璿、王建程、朱美蓮、陳怡仁

執行期間：111 年 1 月 1 日至 111 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 440 萬元整

*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

壹、摘要(字數以不超過 600 字為原則，應包括研究目的、研究方法、
主要發現、結論及建議事項，並填寫 3-5 個中英文關鍵詞)

一、中文摘要.....(3-4)

二、英文摘要.....(5-6)

貳、本文

一、前言.....(7-17)

二、計畫目標.....(18-19)

三、重要工作項目及實施辦法.....(20-31)

四、結果與討論.....(32-41)

五、結論與建議.....(42-44)

六、參考文獻.....(45-49)

七、圖表.....(60-68)

參、經費支用情形.....(69)

壹、摘要

一、中文摘要

2022 年 1/1~10/31 共偵測出 1 例境外移入屈公病病例，來自柬埔寨。無茲卡病毒感染症病例。2020-2022 年受到嚴重特殊傳染性肺炎(COVID-19)疫情影響，實施邊境管制措施，使境外移入病媒病毒傳染病(如登革熱及屈公病等)病例數降低。日本腦炎是台灣的地方性傳染病，2022 年 1/1~10/31 偵測出 19 例日本腦炎病例。病例分布全國，台南市(4 例)、嘉義縣(2 例)、雲林縣(2 例)、彰化縣(2 例)、台東縣(2 例)及新北市(2 例)等。漢他病毒感染症是台灣的地方性傳染病，2022 年 1/1~10/31 共偵測出 3 例漢他病毒感染症病例，感染地為台北市(1 例)、新北市(1 例)及桃園市(1 例)。漢他病毒 RT-PCR 陽性檢體之定序結果皆屬於首爾病毒(Seoul virus; SEOV)。

日本腦炎病毒傳染病快速檢測試劑之檢測效率評估:本計畫的主要目標在開發以酵素免疫分析法及免疫色層分析法 (Immunochromatographic test; ICT) 為基礎的日本腦炎抗體快速檢測試劑之檢測效率評估，期能迅速偵測茲卡、日本腦炎及屈公病的境外引進及流行，有助於快速檢測出傳染病種類，及早實施防疫工作，對病人實施正確的醫療照顧，對傳染病的防治工作有極大的幫助。

因應氣候變遷及國際交流頻繁，節肢病毒介入頻繁，並病媒族群密度增加及擴大孳生範圍，大幅提升節肢動物媒介傳染病 (arthropod-borne disease) 的發生風險，目前國內對病媒蚊的控制的主要方法屬傳統的孳生源清除及適時使用殺蟲劑以快速降低病媒蚊及殺死帶病毒雌蚊。然而孳生源清除需先找到幼

蚊，需要有經驗的病媒蚊專家，而長時間使用殺蟲劑將導致病媒產生抗藥性而降低防治成效且對環境造成危害等問題，所以全世界均希望找到自行防治的技術，例如釋放帶有沃爾巴克氏菌的蚊蟲。雖然此病媒防治技術已在多國進行試驗，本國環保署雖已訂定法規將 *Wolbachia pipientis* 列為防制環境衛生病媒之微生物製劑，然實驗室間對病毒的效果仍有許多矛盾處。因此本計劃的目的為建立沃爾巴克氏菌體外培養技術，進行沃爾巴克氏菌密度對節肢病毒之效果，包括登革病毒和茲卡病毒，提供該菌對蟲媒傳染病防治的參考。

關鍵詞：病媒病毒傳染病、監測、茲卡病毒、屈公病毒、日本腦炎病毒、漢他病毒、酵素免疫分析法、免疫色層分析法、節肢病毒、沃爾巴克氏菌

二、英文摘要：

Between January 1 and October 31, 2022, only one imported chikungunya cases was identified. The case arrived from Cambodia. Affected by the COVID-19 pandemic in 2022, border control measures have been implemented to reduce the number of imported cases of vector-borne viral infectious diseases (such as dengue and chikungunya). No imported and indigenous cases of Zika virus infection were identified this year.

Japanese encephalitis is an endemic disease in Taiwan. A total of 19 cases of Japanese encephalitis have been detected in 2022. There were 4 cases in Tainan City, 2 cases in Chiayi County, 2 cases in Yunlin County, 2 cases in Changhua County, 2 cases in Taitung County, 2 cases in New Taipei City, etc.

Hantavirus infection is an endemic infectious disease in Taiwan. A total of 3 cases of Hantavirus infection have been detected in 2022. One case was in Taipei City, 1 in New Taipei City and 1 in Taoyuan City. RT-PCR positive sample was sequenced and the virus genome sequence belonged to Seoul virus (SEOV).

Rapid and accurate diagnosis of arbovirus infection contributes greatly to disease surveillance, patient management in hospitals and control measures in public health. The main objective of this project is to develop ELISA- and immunochromatographic test (ICT)-based arbovirus antibody detection kits. The ICT-based detection kits can offer faster, cheaper and more efficient than traditional laboratory. Rapid point-of-care testing for specific detection Japanese encephalitis, Zika and chikungunya infection during late-acute and convalescence phase in order to implement clinical treatment and control measure in public

health.

With climate change and the increase of international trade as well as people travel around the world via convenient transportation causing the contagious diseases, especially arthropod-borne disease spread rapidly and put people in the risk of hazard. In Taiwan, vector control heavily relies on source reduction and insecticide application, especially in the case of disease case confirmed. However, repeat exposure of insecticide not only cause the emergence of insecticide resistance but also pollute the environment. Vector control using *Wolbachia* is an effective tool and the field trial carried out in some countries revealed positive aspect. Taiwan EPA have put *Wolbachia pipientis* on the list of a microbiological agent for environmental vector control. However, the scientific reference of Taiwanese *Wolbachia* is poorly understand. In this project, we plan to survey the species and distribution of Taiwanese *Wolbachia* in disease vector. To assess the role of *Wolbachia* in inhibition of pathogens, including dengue virus, and zika virus, the in vitro culture system will establish in the study for *Wolbachia* isolation and propagation from its original host, this study could provide the information to assess the potential of *Wolbachia* for disease vector control.

Keyword: Vector-borne infectious diseases, surveillance, Zika virus, Chikungunya virus, Japanese encephalitis virus, Hantavirus. ELISA, immunochromatographic tes, arthrovirus, *Wolbachia*,

貳、本文

一. 前言

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

屈公病(Chikungunya)是由蚊子傳播的病毒性疾病，症狀為發燒，皮疹，肌痛和關節炎等，很少有致死病例，但有些病人的關節痛可能持續數月至數年。屈公病毒(CHIKV) 屬於披膜病毒科(Togaviridae)的甲病毒屬(Alphavirus)，CHIKV 為單股正向 RNA 病毒，全長約 12 kb，基因體結構除了 5'與 3'端的非轉譯區外，有 2 個轉譯區，一轉譯區長約 7.4 kb，包含 4 個非結構蛋白基因 nonstructural polyprotein (nsP1, 2, 3, and 4)，另一轉譯區長約 3.7 kb，包含結構蛋白基因(C, E3, E2, 6k and E1)。2 個轉譯區由 65 nucleotides 連接。屈公病毒有 3 種基因型，包括西非(West African genotype)，東/中/南非 (East/Central/South African genotype) 和亞洲(Asian genotype) 基因型(1)。自 2000 年以來，CHIKV 在非洲和亞洲出現大流行。2013 年後，CHIKV 到達美洲，也引發了中美洲的大流行(2)。CHIKV 主要由埃及斑蚊和白線斑蚊傳播。自 2005 年開始監測屈公病以來，2019 年首次發現有本土病例，流行於新北市土城及中和區。(3-5)

茲卡及日本腦炎病毒屬於黃病毒科(Flaviviridae)，黃病毒屬(Flavivirus)的病毒。黃病毒為單股正向 RNA 病毒，全長約 11 kb，基因體結構除了 5'與 3'端的非轉譯區外，轉譯區依序可分為 3 個結構基因[Capsid (C), Premembrane/Membrane (prM), Envelope (E)] 與 7 個非結構基因[Non-structural protein 1: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5]共 10 個基因 (6)。茲卡病毒(Zika virus)最早在 1947 年於烏干達茲卡森林中的彌猴體內分離出來，1954 年在奈及利亞首次發現人類感染病例。其後在非洲及亞洲出現少數散發病

例，直到 2007 年在密克羅尼西亞(Micronesia)聯邦的雅蒲島(Yap Island)爆發較大規模的流行 (7, 8)，2013 年玻里尼西亞等南太平洋島嶼地區，又爆發大流行。其後在 2015 年 5 月，世界衛生組織(WHO)證實巴西東北部出現本土的茲卡病毒感染確診病例，為美洲地區首例。2016 年疫情已擴增至中、南美洲數十個國家/屬地 (9)。東南亞的疫情也有漸增的趨勢。茲卡病毒可分為亞洲基因型和非洲基因型兩種基因型別。茲卡病毒的傳染方式包括：(一)病媒蚊(埃及斑蚊及白線斑蚊)傳播；(二)性行為傳染；(三)母嬰垂直傳染及(四)輸血傳染等。茲卡病毒感染約有 80%的個案沒有明顯症狀，有症狀的患者通常出現皮疹和發熱，伴有關節痛，關節炎或非化膿性結膜炎。2015 年，巴西的嬰兒小頭症數量增加與母親的茲卡病毒感染有關，此外，成人的神經系統也可能因感染茲卡病毒導致異常(10, 11)。2016 年 WHO 宣布 ZIKV 流行是國際關注的公共衛生緊急情況 (PHEIC)。2016 年一月台灣首次發現茲卡病毒境外移入病例 (12)。

日本腦炎的流行區包含了大部份的亞洲地區、西太平洋島嶼及澳洲北部，也是亞洲地區最重要的病毒性腦炎傳染病。每年約有 35,000 至 50,000 日本腦炎病例，造成約 10,000-15,000 人死亡。由於日本腦炎，是經由病媒蚊的傳播，所以疫情的流行與氣候及季節兩大因素有關 (13)。在熱帶地區，日本腦炎為散發性流行，全年皆有；在溫帶及亞熱帶地區，日本腦炎的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季，發生的型態是爆發性。由於預防注射的有效實施，日本、南韓、臺灣及中國大陸的病例已減少很多，但鄰近的許多國家，包括菲律賓、印尼、馬來西亞、印度、尼泊爾等國都有許多日本腦炎患者，也常有流行的發生。

目前已知至少有五屬二十六種蚊子能傳播日本腦炎，其中最主要的病媒蚊為三斑家蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)；此外環紋家蚊(*C. annulus*)、白頭家蚊(*C. fuscocephala*)、尖音家蚊(*C. pipiens*)、白吻家蚊(*C. vishnui*) 和環喙家蚊(*C. annulirostris*)等均能媒介此病 (14)。流行初期，病毒利用動物→蚊→動物的方式傳播，當流行範圍擴大後出現動物→蚊→人的途徑。臺灣以豬為主要增幅動物，豬將病毒增幅後開始人的流行。台灣流行季節主要在每年4至10月，病例高峰通常出現在6-7月。(15, 16)

台灣在1955年將日本腦炎列入通報傳染病，1968年開始全面實施疫苗接種，民眾罹患日本腦炎的情況即大幅改善。目前每年的確定病例數在20-40之間，成為可以控制的傳染病。

在日本腦炎病毒分子流行病學研究方面，依據E基因親緣性分析可將日本腦炎病毒分成5種基因型別，即Genotype I-V (17-19)，1990年以前，Genotype III病毒株是亞洲主要的流行株。然而，在過去20年間各國的監測研究資料顯示，Genotype I病毒株已陸續傳播至中國、日本、越南、韓國、和泰國(20-23)等地，並逐漸取代Genotype III病毒株。Nabeshima等人報告Genotype I病毒株常自東南亞和東亞大陸引進日本(24, 25)，雖然其傳播機制並不十分清楚，但可能的途徑包括帶病毒的病媒蚊隨風遷移並傳播病毒、候鳥的遷徙等。台灣在2005-2007年的日本腦炎病毒分離株皆屬於Genotype III，在2008年首次發現有2株病毒屬於Genotype I。2009-2015年，則發現大部分陽性病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於Genotype I，僅少數地方的日本腦炎病毒屬於Genotype III (16)。

漢他病毒感染症為一種急性人畜共通病毒性傳染病，由漢他

病毒感染造成，該病毒係屬布尼亞病毒科(Bunyaviridae)之漢他病毒屬(Hantavirus)，依其抗原性的不同，至少有二十種以上不同血清型別的漢他病毒存在，分布在不同的地理區域，且各有其特有的哺乳類動物宿主(26)。臺灣從 1995 年首次發現由大陸移入的漢他病毒出血熱病例後，2001 年至今也累積約有 30 多個確定病例。由過去研究報告得知，臺灣地區具有多種漢他病毒潛在天然宿主，包括嚙齒目的黃胸鼠(*Rattus flavipectus*)、小黃腹鼠(*R. losea*)、溝鼠(*R. norvegicus*)、亞洲家鼠(*R. tanezumi*)、鬼鼠(*Bandicota indica*)、家鼯鼠(*Mus musculus*)與赤背條鼠(*Apodemus agrarius*)，以及食蟲目的錢鼠(*Suncus murinus*) (27, 28)等，其中溝鼠、亞洲家鼠、家鼯鼠及錢鼠喜愛居住於人類活動（屋宅等）之環境區域。除 2020-2021 年外，臺灣漢他病毒感染病例數並不多，絕大多數為散發病例 (29)。

本計畫建置之屈公、茲卡、日本腦炎及漢他病毒基因資料庫，將有助於了解這些病毒在臺灣及鄰近國家的演化情形，分析本土流行病毒株的可能來源及擴散情形，提供緊急防治上的參考及對策。

(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

本計畫建置之屈公、茲卡、日本腦炎及漢他病毒基因資料庫，將有助於了解這些病毒在臺灣及鄰近國家的演化情形，分析本土流行病毒株的可能來源及擴散情形，提供緊急防治上的參考及對策。

由於國際間交通往來日益頻繁及溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲 (mosquito) 及壁蝨 (Tick) 所媒介的節肢動物媒介病毒

(arthropod-borne viruses, Arbovirus) 傳染病最為重要(1-9)。目前歸類為節肢動物媒介的病毒有 500 多種，其中超過 100 種可感染人

類，主要為黃病毒（flaviviruses）及阿爾發病毒（alphaviruses）。由黃病毒引起的主要疾病為登革熱（dengue fever）、茲卡(Zika)、黃熱病（yellow fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、西尼羅熱/腦炎（West Nile fever/encephalitis）及壁蝨腦炎（Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV）等；由阿爾發病毒引起的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine encephalitis, EEE）、西方馬腦炎(Western Equine encephalitis, WEE)及委內瑞拉馬腦炎(Venezuelan equine encephalitis, VEE)等。

由於節肢動物媒介病毒，特別是 2016 開始引起全球關注，會在胎兒引起小腦症及在成人引起 Guillain-Barré syndrome 的茲卡病毒，是目前全球最重要的病媒性傳染病。茲卡 2007 年第一次在雅浦島爆發小規模流行，之後在 2015 年巴西報導相關疫情並提出會引起嬰兒的小腦症後，引發全球譁然與關注。目前已橫跨非洲、美洲、亞洲及太平洋區，尤其目前美洲與東南亞疫情日益嚴峻。屈公病為近年來在非洲及亞洲造成許多疫情的再浮現病媒性傳染病。屈公病 2004-2005 在非洲及西印度洋島嶼開始爆發疫情後，病毒已由印度傳播至東南亞許多國家並造成流行(4-6)。茲卡、屈公病毒及黃熱屬病毒主要是由埃及斑蚊所傳播，其次是白線斑蚊。埃及斑蚊在台灣分佈於北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。目前在印度及東南亞國家流行的屈公病毒株很有可能已變異為更適合於白線斑蚊體內繁殖並藉由其傳播的病毒株，這些病毒株的出現有可能對台灣造成更嚴重的威脅及更廣泛的流行。

目前實驗室診茲卡、登革熱及屈公病的檢驗方法(10-15)包含細胞培養分離病毒（約 7 天）、RT-PCR（以 real-time RT-PCR 為主、約 5 小

時)、酵素免疫分析法(以 capture IgM/IgG ELISA 為主、約 4 小時)、免疫螢光抗體分析法(immunofluorescent antibody assay、IFA、約 4 小時)及色層免疫分析法(Immunochromatography test、ICT, 約 15-30 分鐘), 其中 real-time RT-PCR 係檢測急性期病毒核酸(1-7 天), 由於 real-time RT-PCR 具有高靈敏度及快速等優點, 已取代病毒分離培養法成為急性期的標準檢驗方法, 但也有價格昂貴且操作複雜等缺點, 須特定實驗室方可進行。IFA 與 IgM/IgG ELISA 係檢測恢復期(感染後 5-30 天) IgM 及 IgG 抗體, 具有高靈敏度, 但操作複雜, 也須特定實驗室方可進行。利用色層免疫分析法為原理製作的快速檢驗試劑, 可於 15-30 分鐘內檢測出急性期血清病毒抗原及恢復期血清 IgM 及 IgG 抗體。快速檢驗試劑具有簡單、快速和無需儀器的優點, 很適合用於臨床上 Point of care 之現場(on-site)篩檢, 具有很高的實用價值。

計畫目標在開發以免疫色層分析法為基礎的茲卡病毒、日本腦炎及屈公病等 arbovirus 整合型抗體快速檢測試劑, 研發自製的快速檢測試劑可提升後急性期及恢復期的血清檢驗的靈敏度、降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏。我們最終目標是希望未來能於機場發燒篩檢及醫療院所同進行多種 arbovirus 抗體的同步檢測, 有效阻止境外疾病的引進與本土化。例如結合登革熱抗體與抗原的快篩試劑(有市售試劑), 對於 12.1% PCR(-), IgM/IgG (+)的可能病例 (probable case, 其中包含二次感染個案), 可由 NS1 Ag test 與 IgM/IgG 的陽性結果, 判定為確定病例, 增加登革熱後急性期血清檢驗的靈敏度。

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

因應國際交流頻繁、節肢病毒介入臺灣頻率增加, 加上氣候變遷導致蟲媒更容易生長及擴散, 使得節肢動物媒介 (arthropod-borne

diseases) 的傳染病風險不斷增加[1, 2]。依據本署資料顯示，臺灣登革熱本土 2014 及 2015 年分別有 15,492 及 43,419 個案例[3]。近幾年雖然有明顯趨緩，2018 年仍在中北部等白線斑蚊分布之縣市通報 183 個本土病例、2019 年有 100 個本土病例，2020 仍有 73 例本土病例，且通報境外移入病例於 2019 年達到 10 年來最多，為 510 例。日本腦炎本土案例每年都有 18~37 例，屈公病毒更於 2019 年破冰，累計通報 21 個本土病例，95 個境外移入病例；而茲卡病毒雖然在臺灣沒有本土病例，卻從 2016 年起每年有 3~13 例境外移入病例。上述除了日本腦炎外，其餘病媒性傳染病皆無可用的疫苗，而日本腦炎雖有人用疫苗，在臺灣仍有散發或小群聚通報病例。臺灣的病媒蚊監測持續有捕獲可傳播疾病之病媒蚊，且病媒蚊密度偏高，曾有一個晚上、一盞燈誘捕 4 萬隻三斑家蚊之紀錄，表示國內節肢病毒發生的風險很高。再加上臺灣近年來致力於發展觀光，為避免境外移入個案演變成本土流行，需要抑止病媒蚊的孳生，如何有效控制病媒蚊即為目前防治蚊媒傳染病可行的策略。

依據本署登革熱及屈公病防治工作指引[4]，對於傳播此 2 疾病的病媒蚊控制，除進行平時病媒蚊的監測，高密度時進行孳生源清除與幼蚊防治；在有散發病例時，則輔以殺蟲劑防治，以降低病媒蚊的密度及毒殺帶有病毒的雌蚊。孳生源清除與幼蚊防治均需靠有經驗的病媒專家找到孳生源目標，而長時間使用殺蟲劑將導致病媒產生抗藥性而降低防治成效且對環境造成危害等問題，過去臺灣的研究指出臺灣南部的埃及斑蚊有對殺蟲劑產生不敏感的情形[5]，也有研究顯示南部的埃及斑蚊的抗藥性基因在登革熱流行期的突變頻率有增加的現象[6]，而臺灣地區日本腦炎病媒蚊亦對亞培松有高度抗藥性 [7]，所以若可以使用蚊蟲自行尋找目標，可大幅降低野外靠人防治的困難。

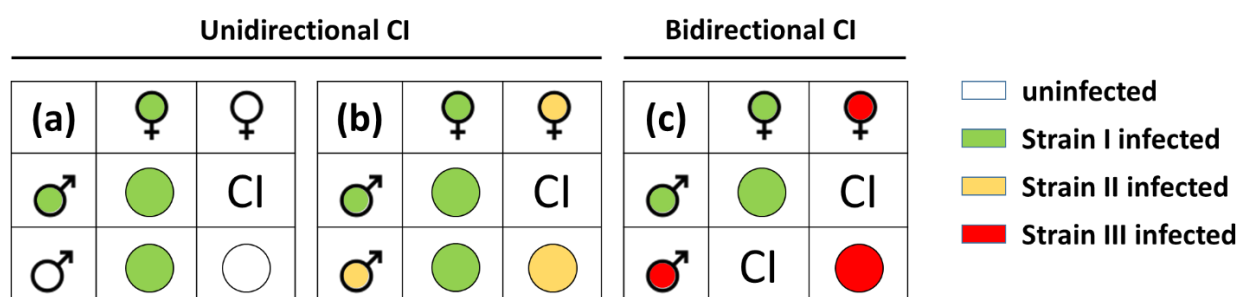
近年來利用釋放蚊蟲作為防治策略的有基因改造蚊蟲及帶 *Wolbachia* 的蚊蟲，其中又以後者對環境較為友善。*Wolbachia* 是立克次體目 (Rickettsiales) 歸於 α -變形菌屬 (α -proteobacteria) 中母系遺傳的絕對細胞內共生菌，根據研究指出 *Wolbachia* 存在於超過一百萬種 (>65%) 的昆蟲體內，是目前所知最廣泛的細胞內共生菌。此菌截止至 2020 年已經分類出除去 G 以外的 A~S 共 18 個超群 (supergroup)，其中以 supergroup A、B 於昆蟲中較為常見。感染 *Wolbachia* 的昆蟲在生殖演化上具有優勢地位，影響效果主要分為 4 個面向：使昆蟲雌性化 (Feminization) [8]、孤雌生殖 (Parthenogenesis) [9]、雄性毒殺 (Male killing) [10] 及細胞間質不相容 (Cytoplasmic incompatibility, CI) [11]，其中以細胞間質不相容最常見。此特性被利用來發展病媒防治的策略，且因 *Wolbachia* 不感染脊椎動物，在使用上對人及環境十分安全 [12-15]。

在細胞研究中顯示 *Wolbachia* 能有效抑制登革病毒量 [16]。有些種類的蟲媒可自然感染 *Wolbachia*，例如野外白線斑蚊族群帶有 wAlbA 及 wAlbB；有些蟲媒種類則尚未發現自然感染 *Wolbachia*。也有研究顯示利用人工感染 (transinfection) 的方式使蚊蟲攜帶 *Wolbachia* 可以降低登革病毒的傳播，也能達成與野外蚊蟲的細胞間質不相容的效果 [17]，而抑制病媒蚊族群密度。Moreira 等人指出埃及斑蚊感染 *Wolbachia* 能透過調節昆蟲生理免疫反應及細胞中生理反應競爭資源而抑制登革病毒及屈公病毒的複製，且茲卡病毒在其他研究也有相似的結果 [18-20]，另外，傳播瘧疾之瘧蚊也可以經由感染 *Wolbachia* 達成對惡性瘧的抗性 [19]。然而，*Wolbachia* 對於病原體的影響在不同的研究結果是不一致的。部份研究指出，白線斑蚊感染 wAlbA 及 wAlbB 對於抑制登革病毒及屈公病毒是沒有有效的 [21,

22]，類似的現象在地下家蚊對西尼羅病毒的傳播能力也能看到[23]。初步認為是與該菌於蚊蟲體內的密度有關[24]，因此在採用 *Wolbachia* 進行野外病媒蚊防治前，應進行相關的評估。

將 *Wolbachia* 應用在病媒蚊防治上的構想有二種，分別為族群抑制策略 (reduction strategy) 及族群取代策略 (replacement strategy)。族群抑制策略目前有中國及新加坡採用此種方法，主要透過釋放帶有 *Wolbachia* 的雄蚊，讓帶有 *Wolbachia* 的雄蚊與野外雌蚊交配後，因細胞間質不相容，其卵無法孵化(下圖 A-a)，再依其雌雄互相交叉 (reciprocal crosses) 所產生子代的情形，分成單向細胞間質不相容(圖 A-b) 及雙向細胞間質不相容 (圖 A-c) [14]，進一步使得野外族群的密度降低，最終藉由降低病媒蚊族群密度達到疾病防治的功效。

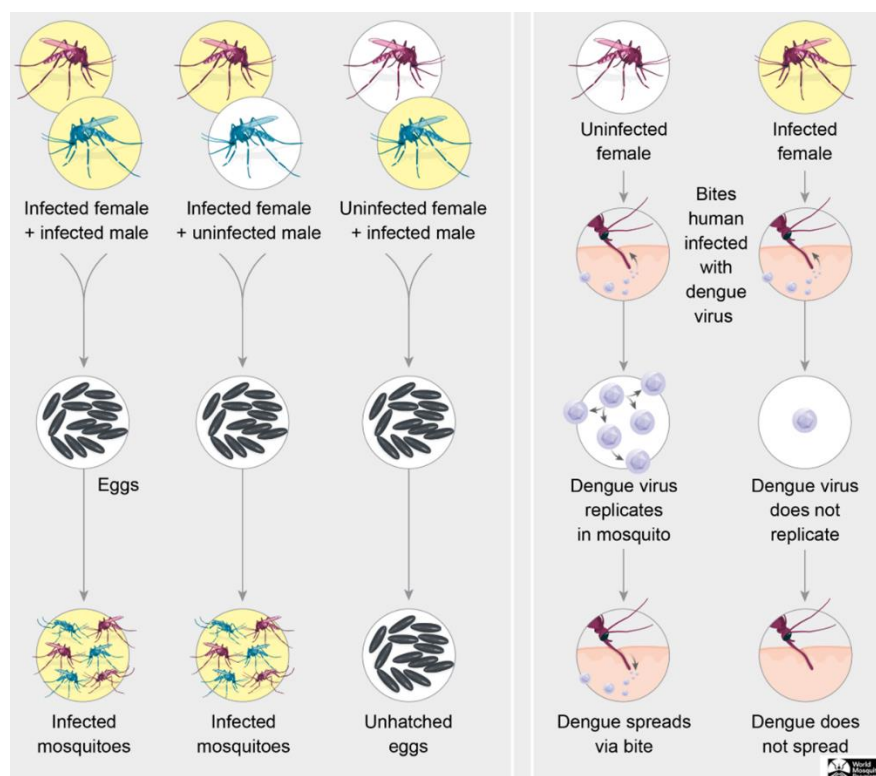
圖 A、*Wolbachia* 族群抑制策略原理



族群取代策略則是透過釋放帶有 *Wolbachia* 之雌蚊，則其產下之卵皆可以孵化，並均帶有 *Wolbachia* [25] (下圖 B-左)。最終達成將野外的病媒蚊全部置換成帶有 *Wolbachia* 之蚊蟲，可降低病原複製與傳播能力，達到預防疾病的功效 (下圖 B、右)。另外，*Wolbachia* 亦能縮短被感染蟲媒的壽命，降低傳播疾病的風險[26, 27]。此技術目前已在巴西、澳洲、哥倫比亞、墨西哥、印度、印尼、斯里蘭卡、越南等地進行野外釋放，結果顯示釋放帶有 *Wolbachia* 之病媒蚊能夠在野外

持續建立族群[24]，然而對疾病之防治效果則尚不明確。

圖 B、*Wolbachia* 族群取代策略原理（摘自 World Mosquito Program）



國內對於 *Wolbachia* 的研究資訊較缺乏，Tsai 等人的研究指出，調查臺

灣 29 種昆蟲中，18 種（51.7%）有偵測到 *Wolbachia*，包括白線斑蚊、白腹叢蚊、地下家蚊、熱帶家蚊等，而瘧蚊、埃及斑蚊及三斑家蚊則無[28]；臺灣南部的白線斑蚊有較高的比例（92.8% - 97.2%）帶有 *Wolbachia*，且在實驗室研究能有效降低登革病毒第一型的病毒量，被認為是否有感染 *Wolbachia* 為南部白線斑蚊在疾病傳播方面與埃及斑蚊相比較不重要的原因之一[29]。雖然 *Wolbachia* 對登革病毒其他血清型或不同節肢病毒的評估仍需進一步釐清，臺灣已於 2018 年底，由環保署將 *Wolbachia pipiensis* 納入環境用藥微生物製劑。

本計劃的目的為調查臺灣過去文獻上有帶病原可能之蟲媒自然

感染 *Wolbachia* 的種類及盛行率，可望能對病媒性傳染病發展新的防治技術。另外，實驗室將利用體外細胞培養技術測試 *Wolbachia* 對節肢病毒的抑制效果，測試範圍包括本土節肢病毒（登革病毒及日本腦炎病毒）及外來病毒（茲卡病毒），以提供國內病媒性疾病防治政策參考。

二. 計畫目標

全程計畫之總目標：

1. 篩檢主動監測及醫師通報病例，偵測茲卡、屈公及日腦病毒等病媒病毒感染病例，並進行病毒分離、定序及演化分析。採集病媒蚊，利用 RT-PCR 篩檢病媒病毒檢體，進行定序及演化分析。
2. 開發以酵素免疫分析法為基礎的快速檢驗試劑，檢測茲卡、登革熱、日本腦炎與屈公等 arbovirus 特異性 IgM 及 IgG 抗體。
3. 評估 *Wolbachia* 菌種(至少包括 *Wolbachia pipientis* 之 wAlbB)及密度(0-1,000 wsp/actin)對於蟲媒病毒(包括登革病毒、日本腦炎病毒及茲卡病毒)的效果。

109 年工作目標

1. 主動監測及醫師通報，監測境外移入病媒病毒之引進及本土流行病毒株之來源及擴散情形分析，病毒株的地理分佈與基因序列，了解病毒株在台灣各地區之演化及引進情形。
2. 利用昆蟲桿菌細胞(真核)或大腸桿菌(原核)系統表現屈公病 E1 與 E2 蛋白與。篩選屈公病單株抗體，組合成偵測登革熱抗原與抗體快速檢驗試劑，分析其靈敏度與專一性。
3. 蒐集台灣蟲媒體內 *Wolbachia* 的種類，建立體外培養技術平臺：以分生檢測進行蟲媒體內沃爾巴克氏菌的種類，並同步建立 *Wolbachia* 體外培養平臺。

110 年工作目標

1. 主動監測及醫師通報，監測境外移入病媒病毒之引進及本土流行病毒株之來源及擴散情形分析，病毒株的地理分佈與基因序列，

了解病毒株在台灣各地區之演化及引進情形。

2. 組裝登革熱抗原及抗體，屈公病、茲卡病毒感染症的抗體快速診斷系統，並分析其靈敏度與專一性;並與其他試劑做比較。
3. 測試 *Wolbachia* 密度對本土節肢病毒抑制效果評估：進行 *Wolbachia* (至少完成 *Wolbachia pipientis* 之 wAlbB) 密度對登革病毒(至少完成 2 個型別)及日本腦炎病毒(至少完成 genotype I) 測試。

111 年工作目標

1. 主動監測及醫師通報，監測境外移入病媒病毒之引進及本土流行病毒株之來源及擴散情形分析，病毒株的地理分佈與基因序列，了解病毒株在台灣各地區之演化及引進情形。
2. 利用昆蟲桿菌細胞(真核)或大腸桿菌(原核)系統表現日本腦炎蛋白，製作免疫層析法為基礎的日本腦炎抗體檢驗試劑，檢測特異性的 IgM 及 IgG 抗體，分析其靈敏度與專一性。
3. 測試 *Wolbachia* 密度對外來節肢病毒抑制效果評估：進行 *Wolbachia* (至少完成 *Wolbachia pipientis* 之 wAlbB) 密度對茲卡病毒測試。

三. 重要工作項目及實施辦法 (含材料與方法)

主要的實施方法及進行步驟

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

1. 病患檢體及病毒株來源：血清檢體來源為通報自疾管署之各種病媒病毒傳染病確定病例血清。病毒來源為疾管署歷年自行分離或購自 ATCC 之各種病媒病毒株。
2. 茲卡、屈公及日本腦炎病毒分離：病毒株係由急性期確定病例血清、尿液或病媒蚊研磨液經由 Vero 或 C6/36 細胞株培養方法所分離。病毒的鑑定方法可使用病毒專一性單株抗體，如 Flavivirus-specific 單株抗體 (D56.3)、JEV group-specific 單株抗體 (E3.3)、CHIKV-specific 單株抗體 (CK1B1) 等做免疫螢光染色，或使用 Real-time RT-PCR 鑑定病毒的種類及血清型別。為避免病毒株產生變異，分離出之病毒株於 T-25 培養瓶擴大培養後即分裝、冷凍於液態氮中。
3. 病毒核酸之抽取及純化：主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核糖核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。病人檢體或每一蚊子 pool 的研磨上清液取 140 μ L，使用 QIAamp viral RNA mini kit (cat. no. 52,906, Qiagen, Hilden, Germany) 及自動化 DNA/RNA 抽取儀 (TaigenLabStart, Taiwan) 萃取病毒 RNA，最後將 RNA 溶於 70 μ l 純水 (Water, containing 0.02% sodium azide)。
4. 引子 (Primer) 的設計與合成：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列。我們用多組引子組來篩選病毒，包括：(1) Flavivirus-specific: FL-F1:
5'-GCCATATGGTACATGTGGCTGGGAGC-3； FL-R3:

5'-GTKATTCTTGTGTCCCAWCCGGCTGTGTCATC-3 ; FL-R4:
5'-GTGATGCGRGTGTCCCAGCCRGCKGTGTCATC-3' ; (2) JEV-specific:
JE3F1: 5'-CCCTCAGAACCGTCTCGGAA-3' ; JE3R1:
5'-CTATTCCCAGGTGTCAATATGCTGT-3' ; (3) CHIKV-specific: CK-F
5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG; CK-R 5'-CCAAAT
TGTCYGGTCTTCCT 。 (4)Hantavirus-specific primers.

5. 利用 RT-PCR 篩檢病毒陽性檢體：用 One-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR 篩檢病毒陽性檢體，使用 Roche Diagnostics，型號：Light-Cycler 96。詳細的檢驗方法如過去的研究敘述(30)：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50 $^{\circ}$ C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，45 次循環之 94 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 20 秒、77 $^{\circ}$ C 30 秒。
6. 核酸定序及分析：對於具有代表性的病毒株，以病毒培養液為材料，進行基因的定序工作，RT-PCR 產物經瓊膠電泳分離及純化後，以 ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) 核酸定序儀定序。以 DNA Star、Clustal W software、MEGA version 6/7 (<http://www.megasoftware.net/>) 進行核酸序列比對及演化親源性分析。

(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

本計畫之實施方法主要分為六部分：(1) 血液檢體、組織之收集；

(2) 基因重組蛋白之製備與純化；(3) 融合瘤之製備；(4) 單株抗體之篩選；(5) 以 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與重組基因蛋白；(5) ELISA 快速檢測試劑之製備與分析；(6) ICT 快速檢測試劑之製備與分析，茲將實驗方法分述如下：

1. 血液檢體、病毒株之收集：血液檢體來源為疾病管制署之各種黃病毒及阿爾發病毒傳染病之驗餘血清。病毒株為疾病管制署歷年來以細胞培養方法分離所得者。病人血清檢體包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人血清中抗原的含量或對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80°C 冷凍櫃長久保存。

2. 基因重組蛋白之製備與純化：

(1) 基因重組蛋白之製備:日本腦炎(JEV)膜蛋白利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段選殖至大腸桿菌 Expresso® Solubility and Expression Screening System，得到七個不同的蛋白質融合表現重組蛋白質。大腸桿菌 Expresso Solubility and Expression system，是利用無連接酶克隆技術，將 PCR 產物分別與七個不同蛋白質融合平行進行建構，簡化了篩選難度並大大增加了表現蛋白的溶解度。許多蛋白在大腸桿菌系統是難以溶解的，解決方法之一是將一段易於溶解的蛋白標記在目標蛋白上幫助蛋白的溶解性，這套組合性載體上分別包含了七種不同的融合蛋白標誌，其中選殖出 slyD 酸性胺基酸幫助了蛋白質的折疊而提高了蛋白質的溶解度，每個載體都

包含用於穩定克隆的 rhaPBAD 啟動子和並在 N 末端有 6xHis tag 以方便親和性管柱純化。融合標籤蛋白與目標蛋白之間有 TEV 蛋白酶識別序列，可以選擇 TEV protease 將表現蛋白進行切割，再透過固定金屬親和性管柱(IMAC) 純化把 TEV 去除，以獲得純度較高的蛋白，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性。

- (2) 將大量表現之重組蛋白以 14,000 rpm、10 分鐘離心收集 *E.coli*，再以 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH₂PO₄, 5mM imidazole, pH 8.0)溶解 *E.coli*，置於 4°C 冰箱一小時後，以 14,000 rpm、10 分鐘離心收取上清液。再將上清液用 Ni-NTA His•Bind® Resin (Merck)進行純化，上清液先通過含有 Resin 的 column 兩次，再以 10 mL 含有 10 mM imidazole 的 wash buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH₂PO₄, pH 8.0)沖洗 column 兩次，接著分別以 8 mL、6 mL 含有 20 mM、40 mM imidazole 的 wash buffer 沖洗 column 一次，最後以 10 mL 含有 500 mM imidazole 的 elution buffer (10 mM Tris-HCl, 8M urea, 100mM NaH₂PO₄, pH 8.0)沖出 N 端帶有 His-tag 的重組蛋白質。將上述純化後之重組蛋白質，以 refolding buffer (50 mM Tris, pH8.0, 400mM L-arginine, 1.0mM GSH, 0.1 mM GSSG) 進行透析，置於 4°C 冰箱，透析三天，至少更換兩次 buffer，最後以 PBS pH7.4 進行最後透析，於八個小時後收取蛋白質。經過透析之後的蛋白質以 1 mL 的體積分裝於 1.5 mL eppendorf，冰存於 -20°C，取其中一支進行 bradford 蛋白質定量，以 O.D 595nm 測定蛋白質濃度。

3. 融合瘤之製備：

(1) 日本腦炎病毒之純化：JEV 來自於受病毒感染 Vero 細胞之病毒細胞培養液。此病毒細胞培養液先經 PEG 將 JEV 病毒沉澱，經離心取得沉澱物，將沉澱物回溶於 TNE buffer (Tris-NaCl-EDTA, PH7.4)，此為經過部分純化之病毒抗原。再將此抗原以 discontinued sucrose density gradient centrifugation (sucrose gradient 10%-50%; 離心 39K rpm, 4 °C, 2 hr) 純化出病毒顆粒。

(2) 將五至六週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內或皮下注射約 20-50 μg 的 10^6 PFU 去活性、純化之 JEV 蛋白，加等體積之 Freund's complete adjuvant (Sigma)。分別間隔三週後，使用相同抗原，再追加免疫注射二次，但改用 Freund's incomplete adjuvant。第四次免疫時，採用靜脈注射，使用不加佐劑之抗原。免疫四次後之小鼠抽取其尾巴血，以免疫酵素法 (ELISA) 測定血清中抗病毒抗體之效價。將高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 FO 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中進行融合，再經含有 HAT (H-hypoxanthine; A-aminopterin; T - thymidine) 之培養液培養 7-14 天後，以 ELISA 方法篩選出會分泌抗 JEV 抗體的融合瘤細胞。再以限制稀釋法 (limiting dilution) 進行單一細胞培養成單株細胞，再重覆進行 ELISA 篩選出分泌抗 JEV 單株抗體的融合瘤細胞株。詳細步驟如下：FO 細胞應於細胞融合前 4~7 天增殖培養，使 FO 細胞在細胞融合當天的生長處於對數期 (log phase)，且細胞數目需大於 3×10^7 。取出小鼠的脾臟細胞直接以 RPMI 培養液清洗 3 次後，將它和 FO 骨髓瘤細胞混合，

在 50 ml 離心管中小心把細胞離心下來，倒掉上清液後以殘留的 RPMI 將細胞打散，放在 37°C 內保溫準備加入 PEG 1500 (polyethylene glycol) 進行細胞融合。在 1.5 分鐘內慢慢加入 1.5 ml PEG，同時一邊輕輕搖動讓 PEG 均勻的與細胞混合。靜置 1.5 分鐘後，在 5 分鐘內緩緩加入 5 ml RPMI，邊加邊混勻；再於 2 分鐘內加入 20 ml RPMI。再以離心去除上清液後，緩緩加入 45 ml HT medium，把細胞均分到 6 個 96 孔培養盤中，每孔加約 2~3 滴（約 75 μ l）細胞懸浮液。培養一天後，加入等量的 H2AT medium。培養第三天後置換 75 μ l HAT medium，每 3-4 天置換一次，當控制組的 FO 細胞死亡後，置換成 75 μ l HT medium，每 3-4 天置換一次。最後每孔只剩下 1 或 2 個穩定細胞群落，再以 ELISA 篩選抗體效價較高者，將該細胞株以限制稀釋法稀釋，每孔中只含有一個細胞，待其生長成群落後再用 ELISA 篩選抗體效價較高者，即為單株抗體融合瘤，經大量培養後，保存至液態氮中。

4. 單株抗體之篩選：由於 ELISA 檢測系統的專一性及靈敏度皆高，故採用此方法作為快速篩選抗體之檢測系統。首先將純化出之 E 與 NS1 Ag（affinity column purified 或重組蛋白抗原）或病毒顆粒用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microtiter well immunoassay strips，4°C 隔夜後，以 1% BSA 進行 Block，37°C 反應一小時，清洗 3 次後，以 PBST（PBS-0.5% Tween20-1% BSA-2.5% NRS）稀釋待測檢體及陽性、陰性控制組檢體，置於 37°C 保溫箱中震盪半小時。清洗 3 次，加入山羊抗小鼠 IgG-alkaline phosphatase 二次抗體（Goat anti-mouse IgG AP）作用於 37°C 保溫箱中震盪半小時，清洗 3 次。每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，置於室溫及暗處呈色反應約

30-60 分鐘，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。以 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與重組蛋白：單株抗體以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A cartridge 親和力管柱 (Bio-Rad Laboratories) 純化；。單株抗體以 AP/HRP 酵素標誌。Lightning-Link (Innova Biosciences, UK) 是以共價鍵結，辨視蛋白質/抗體/胜肽的 amino groups (lysine/α-amino) 來進行標誌反應，以 100μg 的單株抗體與 100ug 的 Lightning-Link-AP 或以 2~400μg 的單株抗體與 100ug 的 Light-Link-HRP modifier 在室溫下反應至少 3 小時後，再以 Quencher reagent 化學反應徹底中止殘餘反應及停止非專一性結合，之後加入 40-50% 抗凍劑 (glycerol) 冷凍保存。

5. ELISA 快速檢測試劑之製備與分析：

- (1) Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法：先以 100μl 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG) 在 4°C 下隔夜吸附 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液 (PBS) 清洗，再用 200μl 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS) 於 37°C 下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100μl 反應 1 小時。清洗後，加入 1:1000~2000 稀釋的 AP/HRP 酵素標誌單株抗體與病毒反應完的複合物 100μl，在 37°C 下反應 1 小時。以 PBS 清洗後，最後加入 100μl 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate)，置於室溫及暗處呈色約 30-60 分鐘，再用微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。
- (2) Indirect IgM and IgG ELISA：先以 1μg/ml, 100 μl/well of 重組蛋白在 4°C 下隔夜吸附 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。再用 200μl 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS)

於 37°C 下進行 1 小時 blocking 作用。以 PBS 清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37°C 反應 1 小時。最後加入酵素受質體 PNPP，於室溫作用 30-60 分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

6. ICT 快速檢測試劑之製備與分析：

(1) 原理：快速免疫色層分析法檢測試劑主要由幾種元件組成，包括樣品墊 (sample pad)、結合墊 (Particle conjugate pad)、薄膜試紙 (Nitrocellulose membrane)、吸收墊 (Absorbent pad) 與底卡。使用噴印設備將測試線 (Test line) 與控制線 (Control line) 塗佈於薄膜試紙上。通常先由樣品墊與結合墊緊密貼合，再與薄膜試紙接合，加上吸收墊，各種元件組裝後，切割至適合尺寸後即完成。其測試原理與一般免疫分析法相同，可用於檢測抗原及抗體。檢測方法簡單，只需將檢體滴入檢測試劑上，幾分鐘內即可獲得結果。

(2) 樣品墊：依檢體種類選擇樣品墊材料，其目的在控制檢體流速，使檢體均勻分佈。

(3) 結合墊：可使用 BioDot 出產之 AirJet，將 colloidal gold、monodisperse latex 或 paramagnetic particle conjugates 噴灑於上。可根據檢測方法，將抗原或抗體與上述材料接合，依 conjugates 種類選擇結合墊材料。Conjugate solutions 通常含有高濃度的 sugars and/or polymers 作為安定劑。

(4) 薄膜試紙：依實驗測試原理，可使用 BioDot 出產之 Front line 或 BioJet 將抗原或抗體塗佈於 Nitrocellulose membrane 之測試線 (Test line) 與控制線 (Control line) 位置。

(5) 樣品墊、結合墊及薄膜試紙通常需要經過前處理及後處理步驟使

其親水性增加、使塗佈其上的蛋白質及薄膜的結構穩定性增加，並防止 non-specific binding。可使用 AirJet Quanti 或經浸泡及高效能烘乾步驟達成。

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

(A)、PCR 方式檢驗 C6/36 細胞中或白線斑蚊體內 *Wolbachia* 的密度

利用本研究所設計專一性 qPCR 引子用於檢測先前建立感染 *Wolbachia* 之 C6/36 細胞株中 *Wolbachia* 密度。16S RNA 為 *Wolbachia* 之專一性引子，mRpS6 為蚊蟲的 housekeeping 基因之專一性引子(如下表 C)。

表 C. 檢測細胞或蚊蟲體中 *Wolbachia* 密度之專一性引子

16S RNA (<i>Wolbachia</i>)	wSpecF	5'-CATACCTATTCTGAAGGGATAG-3'
	16S LR3	5'-ACCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'
mRpS6 (mosquito)	mRpS6-F	5'-AGTTGAACGTATCGTTTTCCCGCTAC-3'
	mRpS6-R	5'-GAAGTGACGCAGCTTGTGGTCGTCC-3'

(B)、帶有 *Wolbachia* 的 C6/36 細胞對茲卡病毒複製適性分析

1. 細胞轉染茲卡病毒：C6/36 細胞株培養於 28°C 定溫細胞培養箱，使用的培養液為 DMEM 透過 1 比 1 的比例混和 MM 培養液，並另外加入 10 % 胎牛血清(FBS)、1 % 非必需胺基酸(NEAA)、1 % HEPES 緩衝劑、1 % GlutaMAX™。將 2×10^5 之 C6/36 細胞種於 24 孔盤中，24 小時後以 PBS 洗去既有培養液即可進行病毒感染實驗。蟲媒病毒以未添加胎牛血清之細胞培養液進行稀釋後，加入總體積為 500 μ l、病毒感染複數(multiplicity of infection, MOI) 為 0.1 的病毒量，總計 1×10^6 之病毒量至細胞中，於 28°C 培養 2 小時，並每 15 分鐘搖晃確保病毒均勻感染細胞。感染反應後以

PBS 清洗去除多餘病毒，並將細胞培養於將於含有 2% 胎牛血清之細胞培養液進行培養和分析。

2. 觀測時間點樣品收集與核酸萃取：收集病毒感染後共 7 個時間點 (第 24、48、72、96、120、144 和 168 小時以) 的上清液及細胞。取上清液共 50 μ l，並使用轉速 200 \times g 離心 10 分鐘以去除可能殘留之細胞。收穫之上清液及細胞使用 Qiagen viral RNA mini kit 萃取 RNA。並使用 Qiagen quantitect qRT-PCR 方法進行蟲媒病毒量檢測。
3. 細胞中病毒量分析：接續上述流程，將萃取所得 RNA 依據 Qiagen quantitect qRT-PCR 方法進行蟲媒病毒量檢測，PCR 反應之內容物包含 RNA 模板 5 μ l、專一性引子各 1 μ l、SYBR green polymerase 10 μ l，RTase 0.2 μ l、ddH₂O 2.8 μ l，總體積為 20 μ l。PCR 分析條件為

(C)、帶有 *Wolbachia* 的白線斑蚊對茲卡病毒的適性分析

1. 建立感染低密度 *Wolbachia* 之白線斑蚊：以實驗室飼養之白線斑蚊品系，以含有 1.25mM 四環黴素(tetracycline)的 10%糖水餵食羽化成蟲 2 周，毒殺體中 *Wolbachia*，接續餵食豬血使其卵巢發育，收集卵片作為實驗用蚊蟲。餵食 10%糖水不含四環黴素之蚊蟲為對照組。
2. 白線斑蚊感染茲卡病毒：將上述以四環黴素處理過之蚊蟲產下之卵片泡水使其孵化為低密度 *Wolbachia* 試驗組，在該蚊蟲羽化後第四天，將雌蚊取出移置飼養杯中，一杯 25 隻並飢餓處理 24 小時，於第五天時進行餵食含有 1×10^6 茲卡病毒(MOI=0.1)的豬血，每個時間點含實驗組和對照組共兩杯，餵血 1 小時。待全部組數蚊子餵完血後放回 25°C 生長箱。

3. 組織解剖收集：感染茲卡病毒後的第 3、7 和 14 天三個時間點為觀測之時間點，當天將含有蚊子之飼養杯取出生長箱，放入-20℃以下溫度的冰箱凍死。再將蚊子放到 10ml 70% EtOH 清洗 5 mins 去除體表髒汙後置換為 10ml PBS，置於冰上。於冰 PBS 中解剖蚊子，分別收取頭部、唾腺、中腸與卵巢等四個部位，將取下之組織放置於含 proteinase K, 100μg/ml 的 PBS 中，保存於-20℃。
4. 萃取蚊蟲、*Wolbachia* 和病毒核酸與偵測病毒表現量：利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核糖核酸結合，再經過數次清洗進而純化核酸。解剖完的蚊子組織之研磨上清液取再使用 QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) 及自動化 DNA/RNA 抽取儀 (TaigenLabStart, Taiwan) 萃取蚊體和病毒 RNA。進一步使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) 為反應試劑偵測茲卡病毒、蚊蟲 housekeeping 基因和 *Wolbachia* 的表現量，依據其操作手冊說明，依序加入 25μl 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，專一性引子 (如下表 D 所示)，0.5μl QuantiTect RT Mix，最後加入 10μl 上述萃取之 RNA，反應最終體積為 50μl。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：於 50℃ 進行反轉錄作用 30 分鐘，再進行 PCR 反應條件為 95℃ 15 分鐘，接續進行 94℃ 15 秒、55℃ 30 秒、72℃ 20 秒共 45 次循環，最後於 77℃ 反應 30 秒。

表 D、偵測 *Wolbachia* 核糖體 16S rRNA、蚊蟲 mRpS6 和茲卡病毒 NS5 基因片段之 qPCR 專一性引子。

Target gene	Primer name	Primer sequences
NS5 (Zika Virus)	Zika-NS5-F	5'-AAGGGARGACTTTRTGGTGTGGA-3'
	Zika-NS5-R	5-'CCCCATCTATTCAGAATCCCTGCT-3'
16S RNA (Wolbachia)	wSpecF	5'-CATACCTATTCGAAGGGATAG-3'
	16S LR3	5'-ACCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3'
mRpS6 (mosquito)	mRpS6-F	5'-AGTTGAACGTATCGTTTCCCGCTAC-3'
	mRpS6-R	5'-GAAGTGACGCAGCTTGTGGTCGTCC-3'

四. 結果與討論

結果

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

1. 屈公病之監測：2022 年 1/1~10/31，來自醫師通報及機場發燒篩檢等主動監測檢體共 1523 件，以 real-time RT-PCR 及 ELISA 篩檢屈公病毒(CHIKV)，共偵測出 1 例屈公病境外移入病例，來自柬埔寨(Fig. 1-2)。
2. 茲卡病毒感染症之監測：2022 年 1/1~10/31，來自醫師通報及機場發燒篩檢等主動監測檢體共 1523 件，以 real-time RT-PCR 及 ELISA 篩檢茲卡病毒(ZIKV)感染症，未偵測出病例(Fig. 1)。
3. 日本腦炎之監測：2022 年 1/1~10/31 來自醫師通報的疑似病例數有 265 件，共測出 19 例日本腦炎病例 (Fig. 3)。6-8 月為流行高峰 (Fig. 4)。病例分布於全國 11 縣市，其中台南市(4 例)、嘉義縣(2 例)、雲林縣(2 例)、彰化縣(2 例)、台東縣(2 例)及新北市(2 例)等 (Fig. 5)。男性病例數有 16 例，遠高於女性病例數(3 例)，感染年齡以 40-59 歲最多，占 68% (Fig. 6)。
4. 漢他病毒感染症之監測：2022 年 1/1~10/31，來自醫師通報的疑似病例數有 118 件，共測出 3 例漢他病毒感染症病例 (Fig. 7)。其中台北市 1 例，新北市 1 例及桃園市 1 例 (Fig. 8)。PCR 陽性之檢體，定序結果屬於首爾病毒(Seoul virus; SEOV)，與大陸廣州 SEOV 最相近 (Fig. 9)。

(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

1. 建置日本腦炎外套膜重組蛋白質體

利用 gene cloning 方法在 E.coli 表現系統上，建置含有日本腦炎病毒外套膜(JE EDIII)基因重組蛋白質的質體基因庫。經生產與純化後可用做酵素免疫分析法(ELISA)及免疫色層分析法(ICT)為基礎的快速檢驗試劑檢驗。

2. 開發偵測日本腦炎 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑

日本腦炎的流行區包含了大部份的亞洲地區、西太平洋島嶼及澳洲北部，也是亞洲地區最重要的病毒性腦炎傳染病。由於腦炎是經由病媒蚊的傳播，所以疫情的流行與氣候及季節兩大因素有關。在熱帶地區，日本腦炎為散發性流行，全年皆有；在溫帶及亞熱帶地區，日本腦炎的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季，發生的型態為爆發性，通常持續二到三個月。臺灣就屬於此類，主要流行季節集中在每年 5 至 10 月，病例高峰出現於 6-7 月，每年的確診人數約 20-30 例，超過 80% 為 40 歲以上的青壯年人口，並有高達 30-50% 的神經性後遺症。日本腦炎病毒依據 E 基因區分成 5 種基因型別，即 Genotype I-V，1990 年以前 Genotype III 病毒株是亞洲主要的流行株。然而，過去的 20 年間各國的監測資料顯示 Genotype I 病毒株已逐漸取代 Genotype III 病毒株。台灣也發現同樣的情形，在 2005-2007 年的日本腦炎病毒分離株皆屬於第三基因型 (genotype III)，2010-2018 年監測結果顯示大部分陽性病媒蚊感染逐漸轉變成以第一基因型 (genotype I)，成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型，故此篇研究以表現第一基因型日本腦炎蛋白為主 (Fig. 1)。2010 年後，根據台灣北中南東區的蚊媒調查結果顯示 Genotype I 已成為最主要的日本腦炎病毒基因型別，初步中和抗體試驗 (PRNT)

結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有很高的交叉反應(cross-reaction)，所以疫苗效力不會因為基因型變化而出現明顯影響。

利用大腸桿菌系統表現系統，將七種 Fusion protein-JE EDIII 進行重組生產蛋白，其中分為可溶性 SlyD、sumo-JE EDIII 蛋白與不可溶 sumo、AVF、His-JE EDIII 蛋白，將產製的重組蛋白分別與 anti-His 單株抗體及確診陽性/陰性血清池(pool) 進行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析，以確認表現蛋白的是否能正確辨識日本腦炎抗體，結果顯示可溶性蛋白對抗體鍵結能力比非溶性蛋白更好，其中 SlyD-JE EDIII 對 JE(+)血清反應最佳且不會有背景值[Fig.2(1)]。小量產的 SlyD-JE EDIII 對日本腦炎、登革熱、屈公病、茲卡陽性及陰性病人血清檢體進行 western blot 實驗，結果顯示 JE EDIII 蛋白是 JEV specific antibody binding，不會與登革熱、屈公熱與茲卡陽性確診病人血清抗體有交叉反應[Fig. 2(2)]，與 ELISA IgM(+)/IgG(-)結果吻合。

將試量產的可溶性蛋白分別以二價金屬鎳離子親和性層析管柱 (Ni-NTA)及離子交換樹脂(IEX)兩種方式進行純化，再將純化後的收集管進行跑膠確認，膠片分析結果顯示 Nuvia Ni-NTA 的 Flow through 量多、Elution 量少，其管柱純化效果較差；IEX 離子交換樹脂方式得到的蛋白純度較高(Fig. 3)。

3. 開發偵測日本腦炎 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑

(1) 將 JEV EDIII 重組蛋白應用於發展 Indirect IgM/IgG ELISA，進行日本腦炎抗體的血清學檢測，我們無法確定用來檢測的病人血清是感染 Genotype I 或 Genotype III 日本腦炎病毒所引發之抗體，但合理認為 2005 年前的感染很可能是抗 Genotype III 病毒，而近幾年應是抗 Genotype I 病毒，因為 2010 年大部分病毒已由 Genotype III shift

到 Genotype I。因此，初步結果顯示蛋白對病人血清中 Genotype I 與 Genotype III 的日本腦炎抗體均可檢測到，**Fig.4(1)**為 ELISA 檢測結果，並將蛋白為基礎的 IgM 酵素免疫分析法與 routine virus dependent IgM ELISA 及市售 SD PanBio JE-DEN combo capture IgM ELISA 的方法檢測 Genotype I 與 Genotype III 病人血清的日本腦炎抗體做評估比較 **[Fig. 4(2)]**。

(2) JEV EDIII 重組蛋白應用於發展 IgM/IgG ICT，將純化後的蛋白與膠體金(colloidal gold)作結合後塗佈於結合墊；goat anti-Human IgM/IgG 抗體塗佈於 Nitrocellulose membrane 之測試線 (Test line) 位置，自製 ICT 試劑檢測結果**(Fig. 5)**與市售 SD Bioline JEV IgM/IgG ICT 試劑進行評估比較，測試結果結果**(Fig. 6)**。登革熱與 JEV 在基因和抗原性上有密切相關，外套膜蛋白具有 54.3% 的氨基酸同源性。因此，由於兩種病毒的相似性，針對 JEV 產生的抗體可能與 DENV 產生交叉反應。我們透過開發日本腦炎高度保守區域序列的重組蛋白，對 JEV 有專一性識別而降低對登革熱的交叉反應做清楚的鑑別診斷。

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

I. 帶有 *Wolbachia* 的 C6/36 細胞對茲卡病毒的適性分析

1. 實驗室先前建立兩株受 *Wolbachia* 感染之 C6/36 細胞株，分別為 B 與 H strain，經 qPCR 分析結果顯示分離自細胞中的 *Wolbachia* 密度約為實驗室品系白線斑蚊體內 *Wolbachia* 數量的 1/6000 ~ 1/90000，為低密度感染(**Table 1**)。因此，接續使用該 2 株帶有不同 *Wolbachia* 密度的 C6/36 細胞進行茲卡病毒(Zika virus)對 C6/36 細胞的感染試驗。

2. 在感染茲卡病毒(MOI=0.1)的 C6/36 細胞株中(如上結果所述，2 株帶有 *Wolbachia* 與沒有 *Wolbachia* 感染的 C6/36 對照組)，兩株帶有不同 *Wolbachia* 密度的細胞株(B 與 H)於病毒感染後 48 至 144 小時的病毒量，均呈現下降趨勢，其中感染後 120 小時 B 與 H 兩株細胞之病毒量與控制組相比，具有顯著差異(**Fig. 1**)，B 及 H 分別抑制了 11.8 及 4.4 倍)。然而，在感染茲卡病毒後的第 7 天，兩株不同密度的 *Wolbachia* 細胞株與控制組相比皆沒有達到顯著抑制的效果，推測是因細胞受病毒感染多日導致細胞死亡所造成。整體而言，具有低密度 *Wolbachia* 的 C6/36 細胞，其 *Wolbachia* 能夠抑制茲卡病毒於細胞內複製。

II. *Wolbachia* 在白線斑蚊體內對抑制茲卡病毒的特性分析

1. 利用四環黴素毒殺白線斑蚊體內 *Wolbachia* 後，成功建立一感染低密度 *Wolbachia* 之白線斑蚊品系(Low-Wol strain)，該蚊蟲體中所帶之 *Wolbachia* 密度相比於現有實驗室對照組品系，約為 1/62 (**Fig. 2**)。

2. 感染茲卡病毒之白線斑蚊，可見茲卡病毒的病毒量隨著感染天數增加，在 14 天時達到高峰(Fig. 3-6, Control)；而在帶有低密度 *Wolbachia* 之白線斑蚊體內的茲卡病毒量卻在感染後的第三天於唾腺、中腸和卵巢皆達到高峰，之後於第七天時驟減，再緩慢上升 (Fig. 4-6, low-*Wolbachia*)；而在帶有低密度 *Wolbachia* 之白線斑蚊頭部，茲卡病毒的病毒量隨著感染天數逐漸上升，於第 14 天達到高峰，與對照組有類似的趨勢(Fig. 3)。

3. 分析茲卡病毒於蚊蟲體中各組織的病毒複製情況，結果顯示：低密度白線斑蚊於感染茲卡病毒三日後，於蚊蟲頭部、唾腺、中腸和卵巢皆可觀察到茲卡病毒大量複製的趨勢(Fig. 3-6)，相較於對照組皆有顯著差異，其中又以卵巢最為明顯(Fig. 6)；但於感染病毒後第七天和第十四天，在蚊蟲頭部、唾腺、中腸和卵巢四組織中，不同密度 *Wolbachia* 對茲卡病毒的生合成的抑制作用皆無明顯差異(Fig. 3-6)。

討論

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

1. 2022 年 1/1~10/31，來自醫師通報及機場發燒篩檢等檢體共 1523 件，以 real-time RT-PCR 及血清學檢測方法篩檢屈公病及茲卡病毒感染，僅發現 1 例境外移入屈公病，來自柬埔寨。2020-2022 年受到嚴重特殊傳染性肺炎(COVID-19)疫情影響，實施邊境管制措施，使境外移入病媒病毒傳染病(如登革熱及屈公病等)的確定病例數降低。
2. 2022 年 1/1~10/31，共偵測出 19 例日本腦炎病例。病例分布全國，北部(新北市 2 例及新竹縣 1 例)、中部(彰化縣 2 例，雲林縣 2 例、南投縣 1 例及苗栗縣 1 例)、南部(台南市 4 例、嘉義縣 2 例、屏東縣 1 例、高雄市 1 例)及東部(台東縣 2 例)。病例性別以男性佔多數，可能較常在戶外活動。年齡分布仍以 40-59 歲為主要感染族群，此年齡層可能對日本腦炎的免疫力較弱。
3. 漢他病毒感染症為一種急性人畜共通病毒傳染病，也是台灣的地方性傳染病。2022 年 1/1-10/31 共偵測出 3 例漢他病毒感染症病例，病例集中於北部(台北市 1 例，新北市 1 例及桃園市 1 例)。過去的研究及監測報告，僅發現台灣有首爾病毒(Seoul virus; SEOV)流行於啮齒類動物，未曾發現其他漢他病毒株。2022 年檢測出 1 例漢他病毒 PCR 陽性，定序結果也屬於 SEOV。為減少受漢他病毒感染，在居家及周圍應落實鼠類防治。

(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

1. 大部分的日本腦炎患者感染後多無明顯症狀，少數會有頭痛、發燒或無菌性腦膜炎，嚴重則可能出現意識改變、腦神經功能損傷、輕癱等，更甚者會使患者昏迷或死亡。這症狀又與腸病毒、腮腺炎病毒、黴漿菌、皰疹病毒及其他病毒引起的腦炎及腦膜炎相似而不易鑑別，需要以病毒的培養或分子生物學、血清學檢驗診斷。且因臨床過程與預後變化較大，恢復期較長，對健康造成極大危害。其中以小孩及老人感染後較容易發生臨床症狀，其他年齡層則較多不顯性感染。日本腦炎之傳播須經由具有感染力的病媒蚊叮咬，人不會直接傳染給人，且日本腦炎病毒在人體內病毒血症的濃度低、時間短，所以病人的血液中通常測不到病毒的存在，所以臨床診斷主要以血清學為主。日本腦炎目前並無特殊藥物治療，只能依病情給予支持性療法。不過，預防勝於治療，因此除了避免蚊子叮咬外，接種疫苗是最好預防法，實施主動監測及清除蚊蟲孳生源仍為防治蚊媒傳染病最主要的方法。
2. JE EDIII 的 ³⁴¹SVASLNDMTPVGRLVTVNPFVATSSANSKV³⁶¹ 肽鏈位於 JEV 位於外套膜 EDIII，為 E 結構區的外部，為高度免疫原性的區域，經相關論文驗證，利用該區域的單株抗體結合可有效阻斷病毒融合且具有強效的抗體中和潛力，文中顯示 SVASLNDMTPVGRLVTVNPF 可測到 JEV+病人血清的 29/30 (96.7%)，而 VGRLVTVNPFVATSSANSKV 可偵測到 JEV+病人血清全部(100%)，完全不會與 JEV-DENV+個案有交叉反應，屬於 JEV type-specific antibody。由於登革熱與 JEV 在基因和抗原性上有密切相關，套膜蛋白所引發的抗體中 group cross-reactive antibody 約佔 70%，故 SD Bioline JEV ICT 中 IgG 抗體會對登革

熱二次感染有嚴重交叉反應。本計畫應用發展 JE EDIII 重組蛋白快速檢測試劑的優點在於 JE-EDIII 與 DEN-EDII 相似性低於 36% 以下，降低交叉反應而能提供鑑別診斷。

3. 研發自製的病媒病毒快速檢測試劑除了為提升後急性期血清檢驗的靈敏度外，還有許多優點，包括可降低檢驗價格、檢驗試劑的來源也不虞匱乏，以提早判定，及時防疫。

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

1. 過去文獻指出 *Wolbachia* 的密度與其抑制病毒的能力成正比 [24]，例如 wAlbB 對登革病毒第二型的抑制，本研究結果顯示相較於未感染 *Wolbachia* 白線斑蚊 C6/36 細胞，帶有 *Wolbachia* 的 C6/36 對於茲卡病毒的生合成確實較為明顯的抑制作用；而不同 *Wolbachia* 密度皆在細胞感染茲卡病毒 48 小時之後皆有抑制病毒複製的趨勢，並於 96 小時達到統計上的顯著差異，此現象與對於低密度 *Wolbachia* 對 2、3 型登革病毒複製適性的抑制作用相似。而第 4 型登革病毒和日本腦炎病毒則對 *Wolbachia* 密度變化的反應不明顯。
2. *Wolbachia* 在體細胞組織中的分佈因物種而異，但於蚊蟲中如埃及斑蚊，*Wolbachia* 共生體可以在頭部、肌肉、中腸、唾液腺、脂肪體和生殖組織中找到 [30]，因此，推測在感染病毒後蚊蟲各組織因 *Wolbachia* 存在與否或是密度高低，對於病毒的抑制作用皆可能受到影響。在本研究中即可看出，*Wolbachia* 在頭部對茲卡病毒的抑制作用即明顯弱於在唾腺、中腸和卵巢的 *Wolbachia*。
3. 許多研究指出可能影響相對 *Wolbachia* 密度的差異的因素，包含個體免疫力、物理生態位或營養資源的獲取等等。例如，雄性果蠅的體細胞中，自噬反應降低了 *Wolbachia* 的密度，但在雌性的生殖細胞中則相反 [31]，再者感染病毒或是微生物所引發 Toll 和 IMD signal pathway 也會導致 *Wolbachia* 密度降低 [32-34]。因此，在本研究中，個組織中所含有的 *Wolbachia* 可能不同，對於茲卡病毒成合成的抑制效果也可能因此受到影響，另外，利用四環黴素毒殺 *Wolbachia* 和感染茲卡病毒引發蚊蟲體內的免疫反應等都可能減弱 *Wolbachia*，因而導致對茲卡病毒的抑制作用減弱。

五. 結論與建議

由於氣候變遷使得生態環境受到衝擊與改變，病原體及其傳播宿主(如登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒及病媒蚊等)因環境暖化，分布範圍日益擴大；又因國際間交通便捷，使得病原體及其傳播宿主可經由交通工具快速散播至全球。目前各種新興及再浮現病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，對人類健康所造成的威脅日益嚴重，因此實施完整的傳染病監測及防治是十分重要的。藉由實驗室為基礎的病毒學即時監測系統，建立病媒病毒傳染病基因資料庫，應用於病毒親緣性關係分析，以瞭解本土流行病毒株之來源、擴散及分布情形及新病毒之引進情形，可以對流行疫情的現況與防治工作提供重要的資訊與對策。未來仍應加強機場發燒篩檢，減少病毒因境外移入所造成的流行，並實施確定病例的擴大疫調及接觸者採檢，以檢驗出無症狀、未就醫及未通報的病例，及早發現指標病例及病毒來源，實施及時的防疫措施。

開發疫苗是防治病媒病毒傳染病最有效的方法，但在理想的疫苗尚未問市之際，實施主動監測，清除蚊蟲孳生源仍為防治蚊媒傳染病最主要的方法。台灣登革熱及屈公病流行主要的原因是由於每年由鄰近東南亞國家引進大量的病毒，加以台灣的病媒蚊密度除了在冬季溫度降至 15°C 以下時較低之外，其他季節皆適合病媒蚊孳生，故登革熱及屈公病易在人口密集及病媒蚊密度高的地區造成流行。登革熱、屈公病及茲卡病毒感染症的傳播途徑皆相同，主要由埃及斑蚊與白線斑蚊所傳播，且鄰近國家皆為疫區，故主動監測及醫師的早期通報，及早發現病例並進行防治工作，對病媒病毒傳染病疫情的控制有很大的幫助。疾管署實驗室可提供快速的監測及檢驗報告，並開發病媒病毒傳染病快速檢驗試劑，縮短檢驗時間，有助於及早發現病例，降低

傳染病的流行。

漢他病毒感染症為一種急性人畜共通病毒傳染病，由漢他病毒感染造成，依其抗原性的不同，至少有二十種以上不同血清型別的漢他病毒存在，分布在世界不同的地理區域，且各有其特有的哺乳類動物宿主。臺灣地區具有多種漢他病毒潛在天然宿主，其中溝鼠、亞洲家鼠、家鼯鼠及錢鼠喜愛居住於人類活動（屋宅等）之環境區域。台灣近十年漢他病毒感染病例數雖不多，絕大多數為散發病例，但2020-2021年的病例數有暴增的現象，仍應預防鼠害。

疾管署實驗室可提供快速的監測及檢驗報告，並開發病媒病毒傳染病快速檢驗試劑，縮短檢驗時間，有助於及早發現病例，降低傳染病的流行。開發屈公病、登革熱、日本腦炎與茲卡抗體快速檢驗試劑，應用於後急性期與恢復期之感染。可將其應用於病媒病毒感染之相關研究。應用這些病媒病毒快速檢驗試劑於醫療院所，對病媒性傳染病疑似病例進行快速檢驗，診斷與監測系統將有助於病媒性傳染病的防治工作。

不同密度的 *Wolbachia* 對不同種病毒的影響不同，未來如欲運用 *Wolbachia* 技術進行蟲媒傳染病的防治，應對目標族群之 *Wolbachia* 帶菌情形及所欲防治病原體進行評估，並持續針對蟲體中之 *Wolbachia* 密度進行監測。

在細胞的試驗中可看出，帶有 *Wolbachia* 的細胞不論對第 2-3 型登革病毒或是茲卡病毒的複製皆有抑制作用，但對第 4 型登革病毒或是日本腦炎病毒的複製適性則無影響，未來如欲運用 *Wolbachia* 技術進行蟲媒傳染病的防治，應進一步了解在 *Wolbachia* 選汰下之蟲媒病毒變化情形及其影響。而白線斑蚊的蚊蟲試驗結果則顯露，帶有 *Wolbachia* 的蚊蟲早在感染第 3 天就可明顯抑制病毒的複製，當

Wolbachia 密度較低時，對病毒的抑制效果立即減弱，但隨著天數增加，抑制病毒的效果持續作用。以上結果可能可以解釋，田間白線斑蚊受到病毒感染時因帶有 *Wolbachia* 抑制病毒複製適性，不易將病毒傳出。

國內目前已將使用 *Wolbachia* 技術進行病媒防治納為防治蟲媒傳染病之政策推行，建議於帶有 *Wolbachia* 的病媒蚊釋放前，釋放期間及釋放後對於蟲媒帶菌情形及所欲防治之病原體進行監測，以評估防治成效。

六. 參考文獻：

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

1. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet*. 2012 Feb 18;379(9816):662-71. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60281-X. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22100854.
2. Perkins TA, Metcalf CJ, Grenfell BT, Tatem AJ. Estimating drivers of autochthonous transmission of chikungunya virus in its invasion of the americas. *PLoS Curr*. 2015 Feb 10;7:ecurrents.outbreaks.a4c7b6ac10e0420b1788c9767946d1fc. doi: 10.1371/currents.outbreaks.a4c7b6ac10e0420b1788c9767946d1fc. PMID: 25737803.
3. Yang CF, Su CL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Huang JC, et al. Imported Chikungunya Virus Strains, Taiwan, 2006-2014. *Emerg Infect Dis*. 2016 Nov;22(11):1981-1984. doi: 10.3201/eid2211.160404. PMID: 27767908.
4. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, et al. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis*. 2009 Nov;15(11):1854-6. doi: 10.3201/eid1511.090398. PMID: 19891886.
5. Chen MY, Huang AS, Yang CF, Hsu TC, Wang TC, Su CL, et al. Chikungunya infection: First autochthonous cases in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2021 Jul;120(7):1526-1530. doi: 10.1016/j.jfma.2020.10.032. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33191091.
6. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245. PMID: 2174669.
7. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687-96. doi: 10.1007/s00705-006-0903-z. Epub 2007 Jan 3. PMID: 17195954.
8. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009 Jun 11;360(24):2536-43. doi: 10.1056/NEJMoa0805715. PMID: 19516034.
9. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jun;20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138. PMID: 24856001.
10. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. 2016 Sep 1;94(9):675-686C. doi: 10.2471/BLT.16.171082. Epub 2016 Feb 9. PMID: 27708473.
11. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol*. 2017 Dec;27:1-7. doi: 10.1016/j.coviro.2017.09.005. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29080429.
12. Huang AS, Shu PY, Yang CH. A new reportable disease is born: Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. *J Formos Med Assoc*. 2016 Apr;115(4):223-5. doi: 10.1016/j.jfma.2016.03.002. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27013110.
13. Vaughn DW, Hoke CH Jr. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev*. 1992;14:197-221. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036087. PMID: 1337744.

14. HU SM, GRAYSTON JT. Encephalitis on Taiwan. II. Mosquito collection and bionomic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1962 Jan;11:131-40. PMID: 14449560.
15. Wu YC, Huang YS, Chien LJ, Lin TL, Yueh YY, Tseng WL, et al. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jul;61(1):78-84. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.78. PMID: 10432061.
16. Su CL, Yang CF, Teng HJ, Lu LC, Lin C, Tsai KH, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus in mosquitoes in Taiwan during 2005-2012. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Oct 2;8(10):e3122. doi: 10.1371/journal.pntd.0003122. PMID: 25275652.
17. Williams DT, Wang LF, Daniels PW, Mackenzie JS. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J Gen Virol.* 2000 Oct;81(Pt 10):2471-2480. doi: 10.1099/0022-1317-81-10-2471. PMID: 10993935.
18. Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Sep;65(3):242-51. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.242. PMID: 11561712.
19. Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardoso MJ, Barrett AD. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia. *J Virol.* 2003 Mar;77(5):3091-8. doi: 10.1128/jvi.77.5.3091-3098.2003. PMID: 12584335.
20. Nga PT, Parquet MDC, Cuong VD, Ma SP, Hasebe F, Inoue S, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(Pt 6):1625-1631. doi: 10.1099/vir.0.79797-0. PMID: 15166447.
21. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12 Suppl):S98-109. doi: 10.1038/nm1144. PMID: 15577938.
22. Nitatpattana N, Dubot-Pérès A, Gouilh MA, Souris M, Barbazan P, Yoksan S, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov;14(11):1762-5. doi: 10.3201/eid1411.080542. PMID: 18976565.
23. Wang HY, Takasaki T, Fu SH, Sun XH, Zhang HL, Wang ZX, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J Gen Virol.* 2007 Mar;88(Pt 3):885-894. doi: 10.1099/vir.0.82185-0. PMID: 17325361.
24. Nabeshima T, Loan HTK, Inoue S, Sumiyoshi M, Haruta Y, Nga PT, et al. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. *J Gen Virol.* 2009 Apr;90(Pt 4):827-832. doi: 10.1099/vir.0.007617-0. Epub 2009 Mar 4. PMID: 19264633.
25. Huang JH, Lin TH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Lu LC, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2010 May;16(5):876-8. doi: 10.3201/eid1605.091055. PMID: 20409392.
26. 衛生福利部疾病管制署：傳染病防治工作手冊漢他病毒症候群。取自：
<http://www.cdc.gov.tw>。
27. 李盈辛、張淑芬、王錫杰等：臺灣國際港埠 2007–2009 年鼠類媒介漢他病毒流行病學調查。疫情報導 2012；28(10)：172–80。
28. 謝瑞煒、王仁德、黃子玫等：臺灣港埠地區鼠類媒介漢他病毒流行病學調查。疫情報導 2008；24(1)：51–62。
29. 張淑芬、楊凱蓉、舒佩芸：2016 年高雄市漢他病毒出血熱事件與鼠類之血清

流行病學調查。疫情報導 2018；34(14)：241-8。

30. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2408-16. doi: 10.1128/JCM.41.6.2408-2416.2003. PMID: 12791857.

(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

1. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.* 2007 Sep;88(Pt 9):2363-2377. doi: 10.1099/vir.0.82858-0. PMID: 17698645.
2. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology.* 2009 Oct 25;393(2):183-97. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.024. Epub 2009 Sep 4. PMID: 19732931.
3. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, Ho MS, Lin TH, Huang JH. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005 Mar;11(3):460-2. doi: 10.3201/eid1103.040420. PMID: 1575756.
4. Zika virus WHO , <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>
5. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond).* 1979 Oct;83(2):213-9. doi: 10.1017/s0022172400025997. PMID: 489960.
6. Su CL, Yang CF, Chang SF, Shu PY . Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes during 2013–2014. 疫情報導 2016;32
7. 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 May;16(5):876-8. doi: 10.3201/eid1605.091055. PMID: 20409392.
8. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, Govero J, Nelson CA, Pierson TC, Diamond MS, Fremont DH. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell.* 2016 Aug 11;166(4):1016-1027. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.020. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27475895.
9. Pushpakumara PD, Jeewandara C, Gomes L, Perera Y, Wijewickrama A, Malavige GN, Goonasekara C. Development and validation of an assay for detection of Japanese encephalitis virus specific antibody responses. *PLoS One.* 2020 Oct 28;15(10):e0238609. doi: 10.1371/journal.pone.0238609. PMID: 33112881.
10. Pushpakumara PD, Jeewandara C, Wijesinghe A, Gomes L, Ogg GS, Goonasekara CL, Malavige GN. Identification of Immune Responses to Japanese Encephalitis Virus Specific T Cell Epitopes. *Front Public Health.* 2020 Feb 12;8:19. doi: 10.3389/fpubh.2020.00019. PMID: 32117854.
11. Fernandez E, Kose N, Edeling MA, Adhikari J, Sapparapu G, Lazarte SM, Nelson CA, Govero J, Gross ML, Fremont DH, Crowe JE Jr, Diamond MS. Mouse and Human Monoclonal Antibodies Protect against Infection by Multiple Genotypes of Japanese Encephalitis Virus. *mBio.* 2018 Feb 27;9(1):e00008-18. doi: 10.1128/mBio.00008-18. PMID: 29487230

12. WHO. 2015. Japanese encephalitis vaccines: WHO position paper—February 2015. *Wkly Epidemiol Rec* 90:69–87

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

1. van Panhuis, W.G., et al., *Region-wide synchrony and traveling waves of dengue across eight countries in Southeast Asia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(42): p. 13069-74.
2. 蔡坤憲、黃雄集、吳文哲, *氣候變遷對蟲媒及蟲媒傳染病的影響*. *台灣醫學*, 2012. 16:5 期: p. 479-488.
3. www.cdc.gov.tw
4. 登革熱屈公病防治工作指引.
5. Huai-Hui Wu, Y.-H.L., Hsiu-Hua Pai, Err-Lieh Hsu, Niann-Tai Chang, and Yi-Pey Luo, *Insecticide resistance status in Aedes aegypti (L.) adults from southern Taiwan*. *Formosan Entomol*. *Formosan Entomol*, 2013. 33: p. 253-270.
6. Chung, H.H., et al., *Voltage-gated sodium channel intron polymorphism and four mutations comprise six haplotypes in an Aedes aegypti population in Taiwan*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. 13(3): p. e0007291.
7. Teng, H.J., et al., *Evaluation of various control agents against mosquito larvae in rice paddies in Taiwan*. *J Vector Ecol*, 2005. 30(1): p. 126-32.
8. Fujii, Y., et al., *Transfection of Wolbachia in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer Ostrinia scapularis causes male killing in the Mediterranean flour moth Ephestia kuehniella*. *Proc Biol Sci*, 2001. 268(1469): p. 855-9.
9. Knight, J., *Meet the Herod bug*. *Nature*, 2001. 412(6842): p. 12-4.
10. Hurst, G.D.D., et al., *Male-killing Wolbachia in two species of insect*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1999. 266(1420): p. 735-735.
11. Breeuwer, J.A. and J.H. Werren, *Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species*. *Nature*, 1990. 346(6284): p. 558-60.
12. Werren, J.H., L. Baldo, and M.E. Clark, *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. 6(10): p. 741-51.
13. Hilgenboecker, K., et al., *How many species are infected with Wolbachia?--A statistical analysis of current data*. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. 281(2): p. 215-20.
14. Sicard, M., M. Bonneau, and M. Weill, *Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes*. *Curr Opin Insect Sci*, 2019. 34: p. 12-20.
15. Flores, H.A. and S.L. O'Neill, *Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes*. *Nat Rev Microbiol*, 2018. 16(8): p. 508-518.
16. Blagrove, M.S., et al., *Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(1): p. 255-60.
17. Dutra, H.L., et al., *Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian Aedes aegypti Mosquitoes*. *Cell Host Microbe*, 2016. 19(6): p. 771-4.
18. Bian, G., et al., *Wolbachia invades Anopheles stephensi populations and induces refractoriness to Plasmodium infection*. *Science*, 2013. 340(6133): p. 748-51.
19. Moreira, L.A., et al., *A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium*. *Cell*, 2009. 139(7): p. 1268-78.

20. Jiggins, F.M., *The spread of Wolbachia through mosquito populations*. PLoS Biol, 2017. 15(6): p. e2002780.
21. Mousson, L., et al., *Wolbachia modulates Chikungunya replication in Aedes albopictus*. Mol Ecol, 2010. 19(9): p. 1953-64.
22. Micieli, M.V. and R.L. Glaser, *Somatic Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) levels in Culex quinquefasciatus and Culex pipiens (Diptera: Culicidae) and resistance to West Nile virus infection*. J Med Entomol, 2014. 51(1): p. 189-99.
23. Tsai, K.H., et al., *Molecular (sub) grouping of endosymbiont Wolbachia infection among mosquitoes of Taiwan*. J Med Entomol, 2004. 41(4): p. 677-83.
24. Lu, P., et al., *Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. 6(7): p. e1754.
25. Walker, T., et al., *The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged Aedes aegypti populations*. Nature, 2011. 476(7361): p. 450-3.
26. Min, K.T. and S. Benzer, *Wolbachia, normally a symbiont of Drosophila, can be virulent, causing degeneration and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(20): p. 10792-6.
27. Koh, C., et al., *Sustained Wolbachia-mediated blocking of dengue virus isolates following serial passage in Aedes aegypti cell culture*. Virus Evol, 2019. 5(1): p. vez012.
28. Tsai, C.H., et al., *The impact of temperature and Wolbachia infection on vector competence of potential dengue vectors Aedes aegypti and Aedes albopictus in the transmission of dengue virus serotype 1 in southern Taiwan*. Parasit Vectors, 2017. 10(1): p. 551.
29. Mee, P.T., et al., *Detection of Low-Level Cardinium and Wolbachia Infections in Culicoides*. Appl Environ Microbiol, 2015. 81(18): p. 6177-88.
30. Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB, Mavingui P. *Persistent Wolbachia and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector Aedes albopictus*. PLoS One. 2009;4: e6388.
31. Deehan M, Lin W, Blum B, Emili A, Frydman H. *Intracellular density of Wolbachia is mediated by host autophagy and the bacterial cytoplasmic incompatibility gene cifB in a cell type-dependent manner in Drosophila melanogaster*. MBio. 2021;12:1–19.
32. Ye YH, Woolfit M, Rancès E, O'Neill SL, McGraw EA. *Wolbachia-associated bacterial protection in the mosquito Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7: e2362.
33. Tortosa P, Courtiol A, Moutailler S, Failloux AB, Weill M. *Chikungunya-Wolbachia interplay in Aedes albopictus*. Insect Mol Biol. 2008;17:677–84.
34. Ware-Gilmore F, Sgrò CM, Xi Z, Dutra HLC, Jones MJ, Shea K, et al. *Microbes increase thermal sensitivity in the mosquito Aedes aegypti, with the potential to change disease distributions*. PLoS Negl Trop Dis. 2021;15: e0009548.

七. 圖表

(一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

Figure 1. 2017-2022 年台灣境外移入屈公病及茲卡病毒感染症之監測

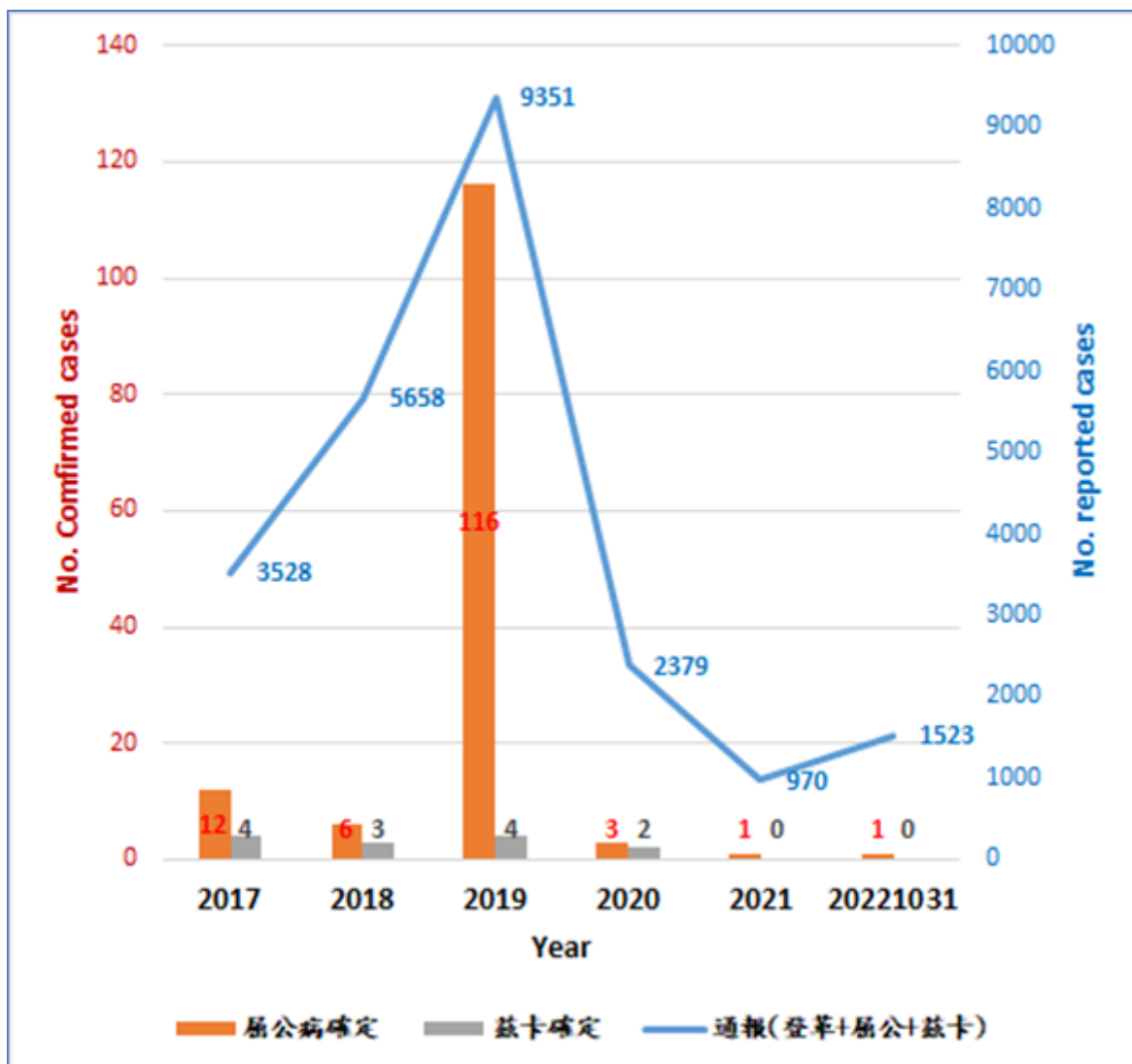


Figure 2. 2017-2022 年台灣的屈公病病例之來源國家分布

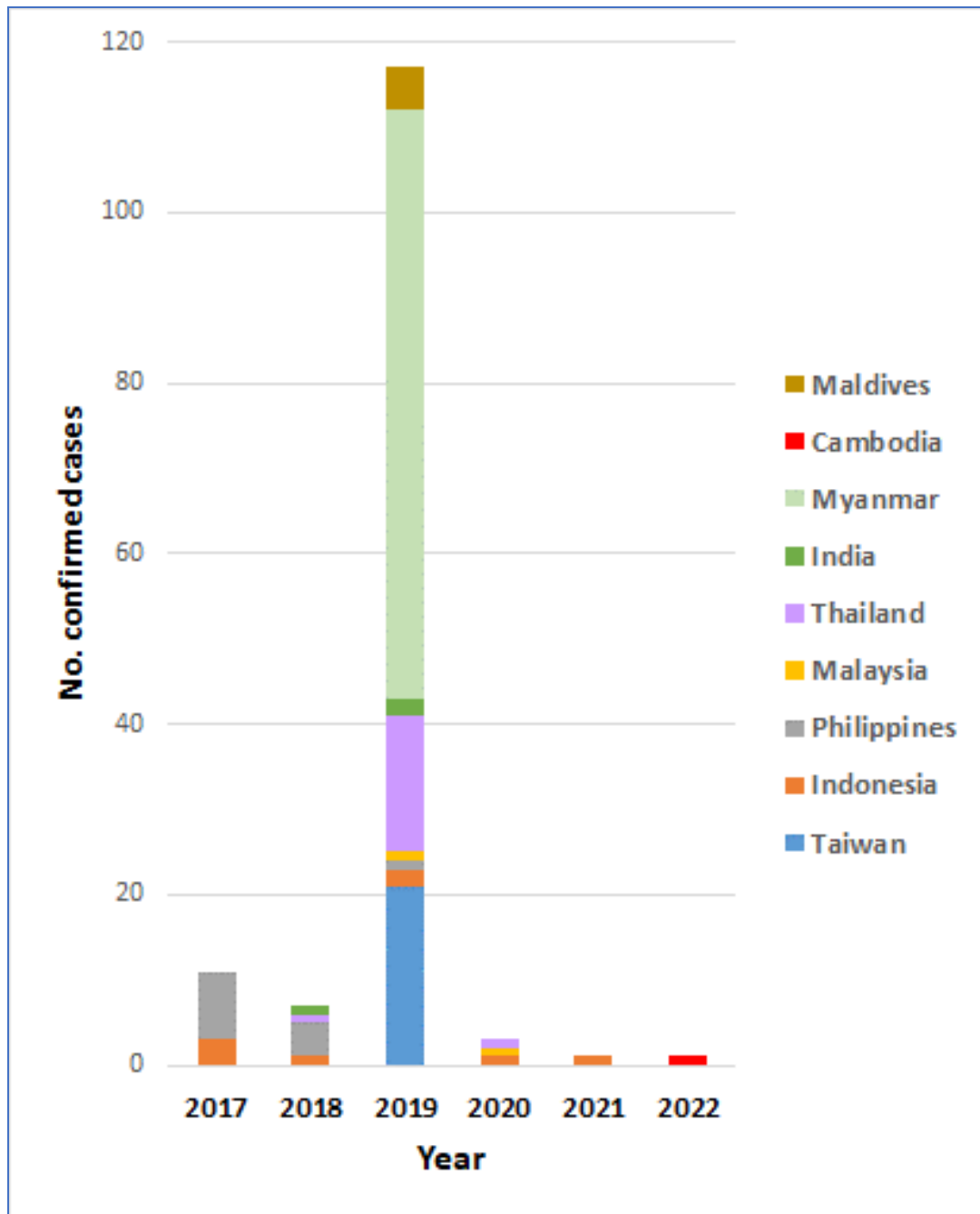


Figure 3. 2016-2022 年台灣的日本腦炎之監測

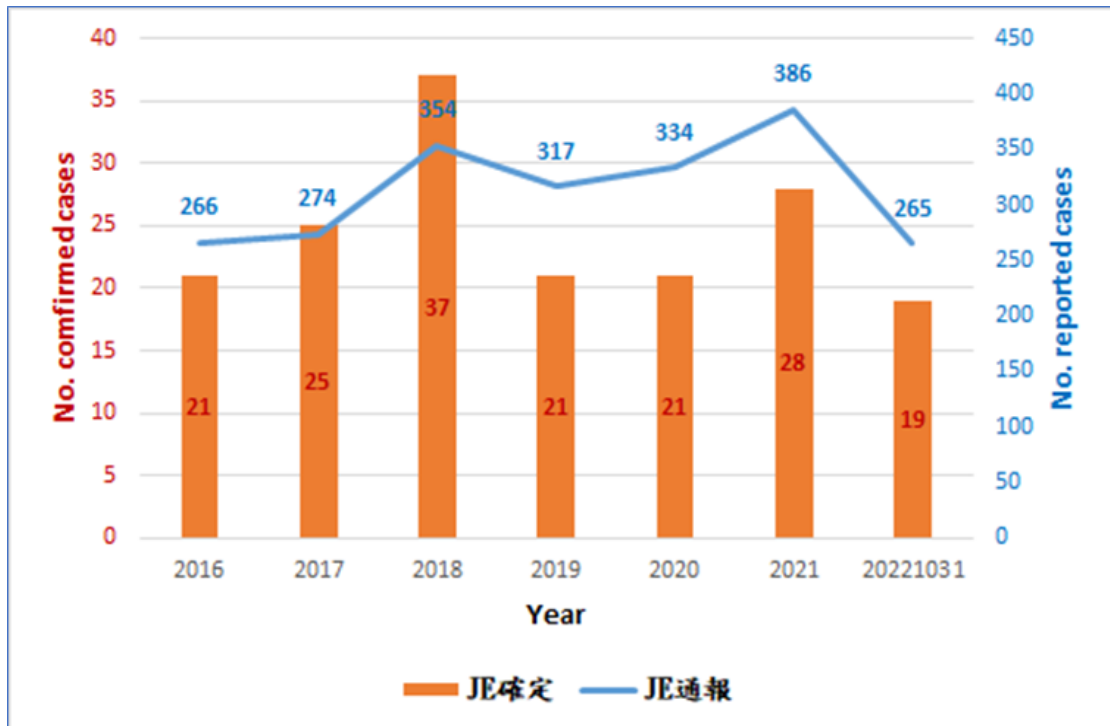


Figure 4. 2018-2022 年台灣的日本腦炎確定病例之月份分布

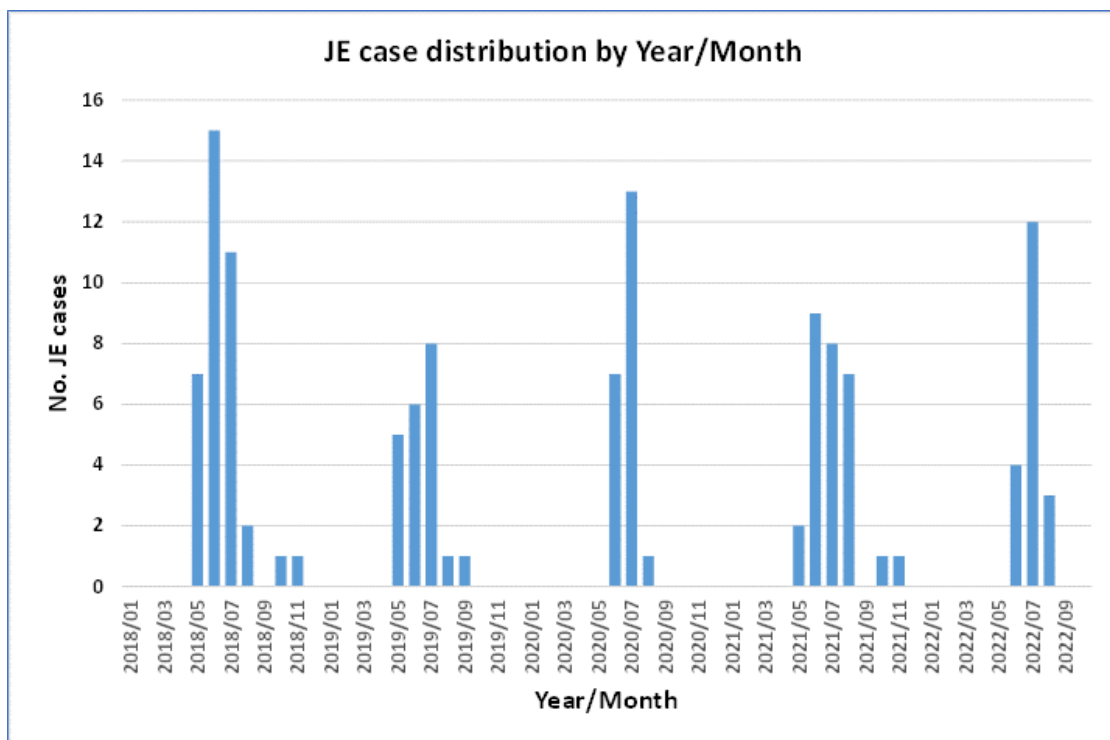


Figure 5. 2022 年台灣的日本腦炎病例之地理分布

附註：病例分布於全國 11 縣市，其中台南市(4 例)、嘉義縣(2 例)、雲林縣(2 例)、彰化縣(2 例)、台東縣(2 例)及新北市(2 例)等。

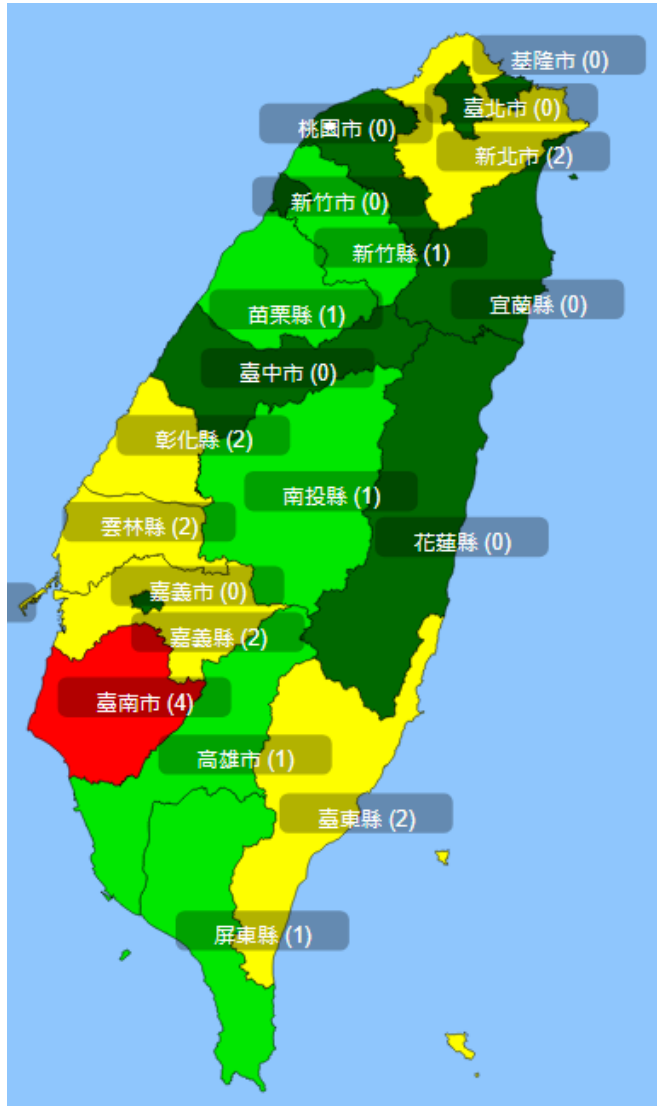


Figure 6. 2022 年台灣的日本腦炎病例的年齡性別分布

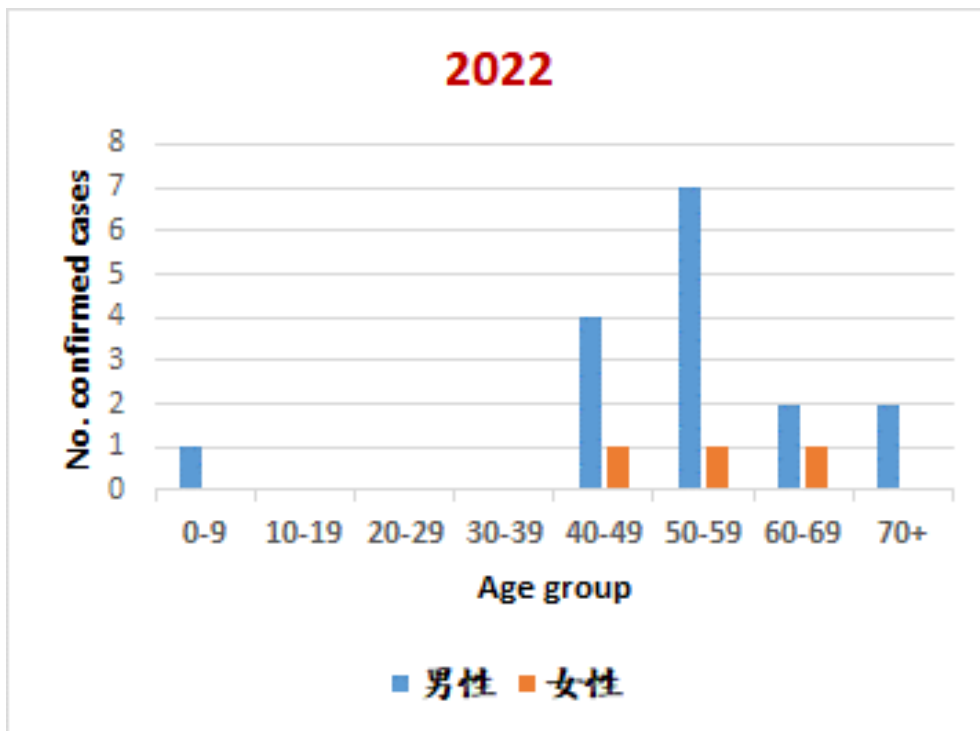


Figure 7. 2016-2022 年台灣的漢他病毒感染症之監測



Figure 8. 2011-2022 年台灣的漢他病毒感染症病例之地理分布

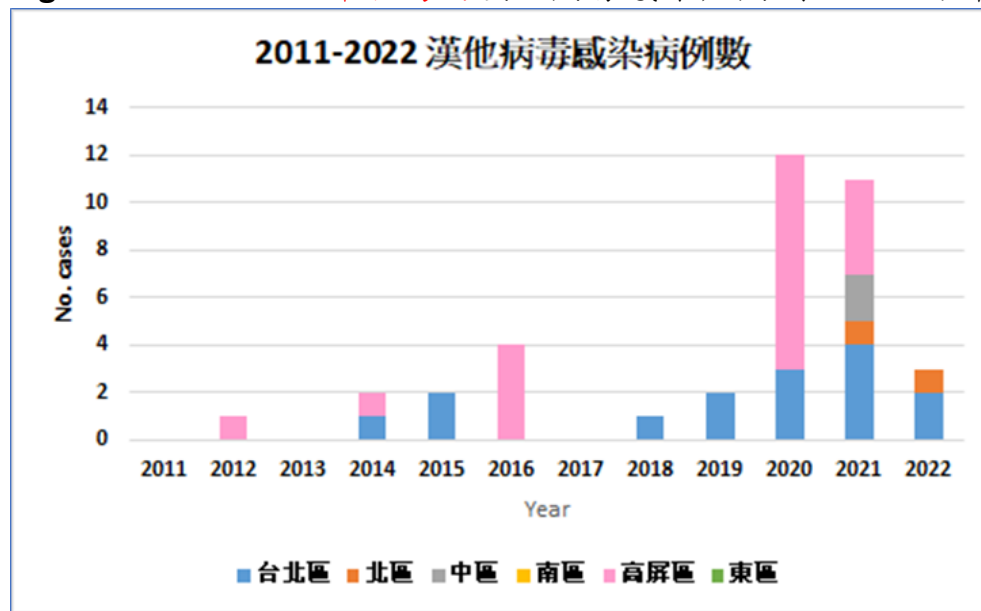
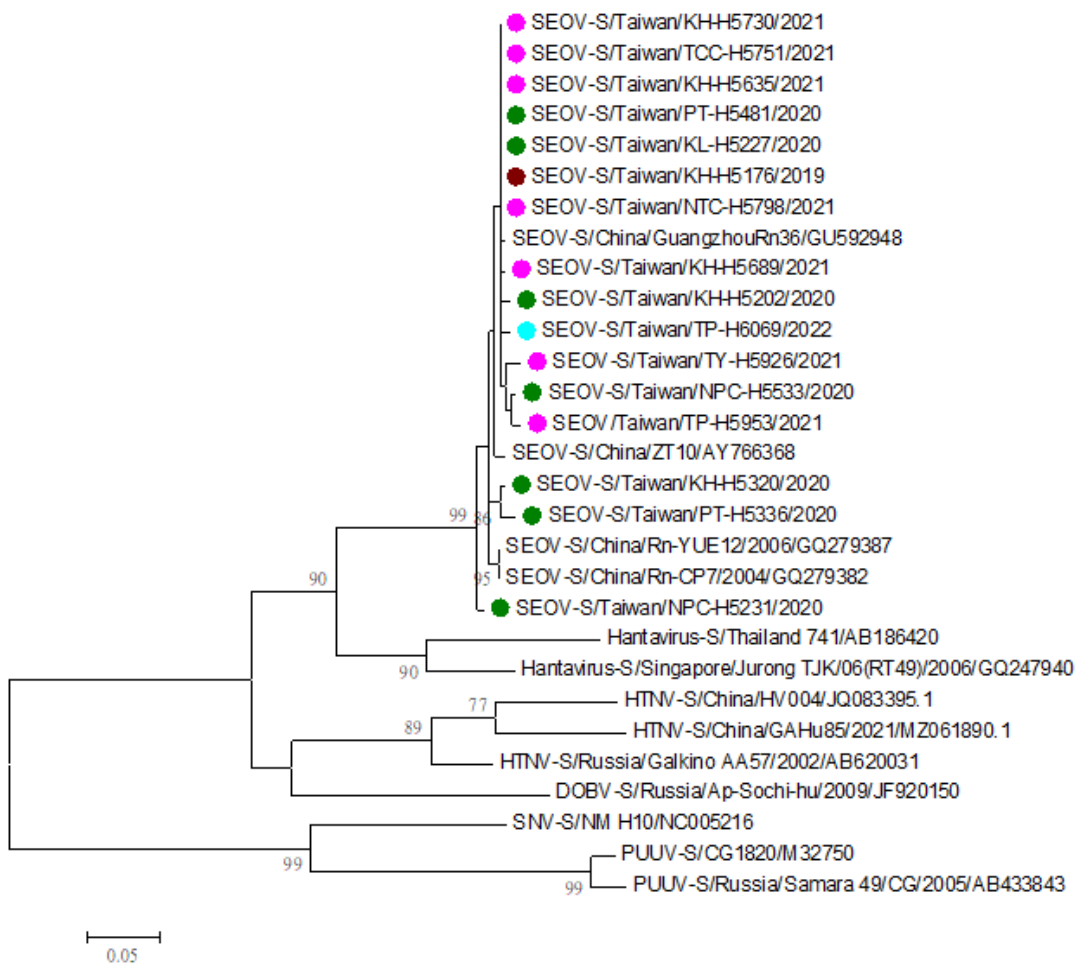


Figure 9. 近年台灣的漢他病毒親緣演化樹



(二)、Arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

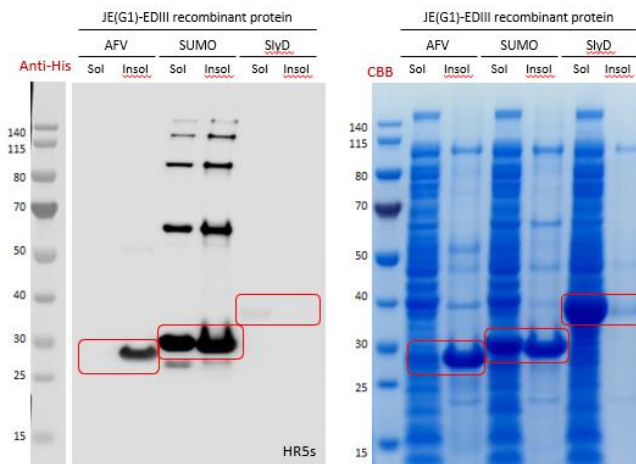
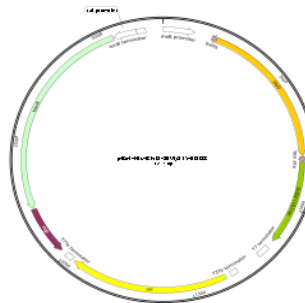
Figure 1 建構及表現日本腦炎 E DIII 重組蛋白

Expression and purification of recombinant JEV Antigen
E.coli Expresso system: JEV_rEDIII

pSol-His-SlyD-JEV-EDIII	
Vector	pSol SlyD
Tag	N-His-SlyD
Strain	JEV/Taiwan/TN1205b/JE101021-G1
Insert size	333nt / 111aa (JEV_E289-399)
rProtein size	321 aa
Molecular Weight	34.5 kDa
Primer Forward	AATCTGTACTTCCAGGGTATGGACAAACTGGCTCTG
Primer Reverse	GTGGCGCCGCTCTATTAGCTTCCAGCTTTGTGCCAG

JE-EDIII Insert 1753-2085 585-695 (E289-399)

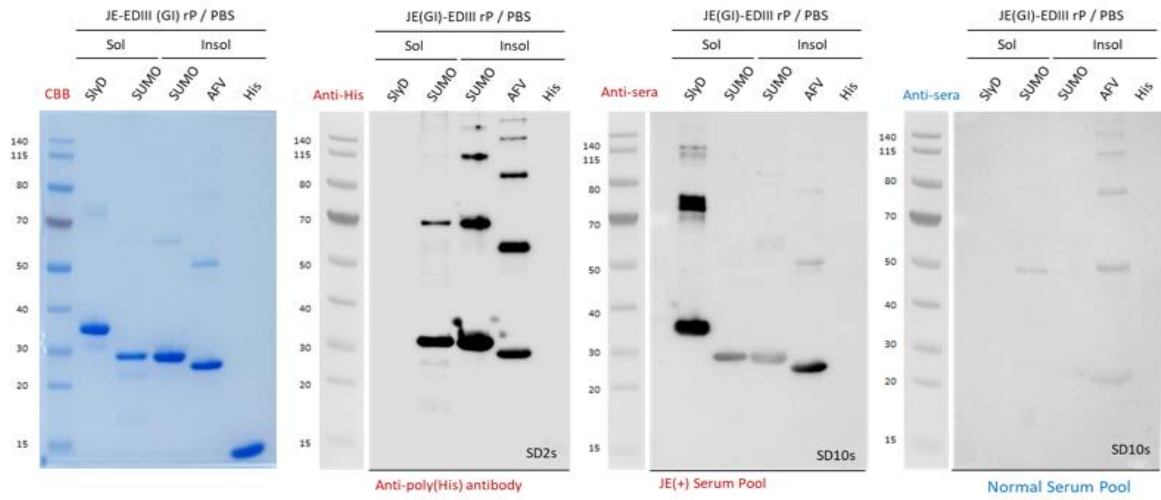
ATGGACAAACTGGCTCTGAAGGGCAGCACTTATGGCATGTG
TACAGAGAAATTCCTGTTTCGCGAAAAATCCAGCGGACACAG
GCCATGGAACAGTTGTCATTGAGCTCACATATTCCTGGAAGT
GATGGTCCCTGC AAAATTCAGATTGCTCAGTCGCGAGTTT
AAACGACATGACCCCTGTGGGAGGCTGGTAACAGTAAACC
CCTTCGTCGCAACATCTAGCTCCAACCTCAAAGGTGCTGGTT
GAGATGGAACCTCCCTTTGGAGACTCTTATATCGTGGTTGG
AAGAGGGGACAAGCAGATTAACCATCACTGGCACAAGCTG
GAAGC
MDKLALKGTTYGMCTEKFSFAKNPADTGHGTVVIELTYSGS
DGPCKIPIVSVASLNDMTPVGR LVTV NPFVATSSNSKVLV
EMEPFPGDSYIVVGRGDKQINHHWKAGS



	pSol-AFV	pSol-SUMO	pSol-SlyD
Fusion tag	13.5	13.3	22.7
JE-E-DIII	11.8	11.8	11.8
MW (kDa)	25.3	25.1	34.5

Figure 2 建構及表現日本腦炎 E DIII 重組蛋白

(1) 選殖與小量試產 JE EDIII 重組蛋白



(2) 日本腦炎 E DIII 重組蛋白並進行血清檢體測試

**E. Cloni 10G JE(GI)-EDIII recombinant protein
Anti-serum Western Blot**

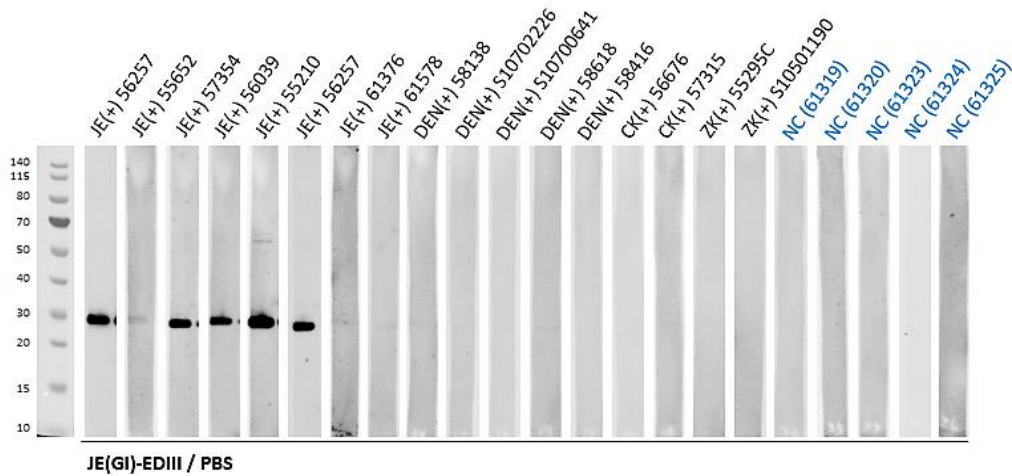
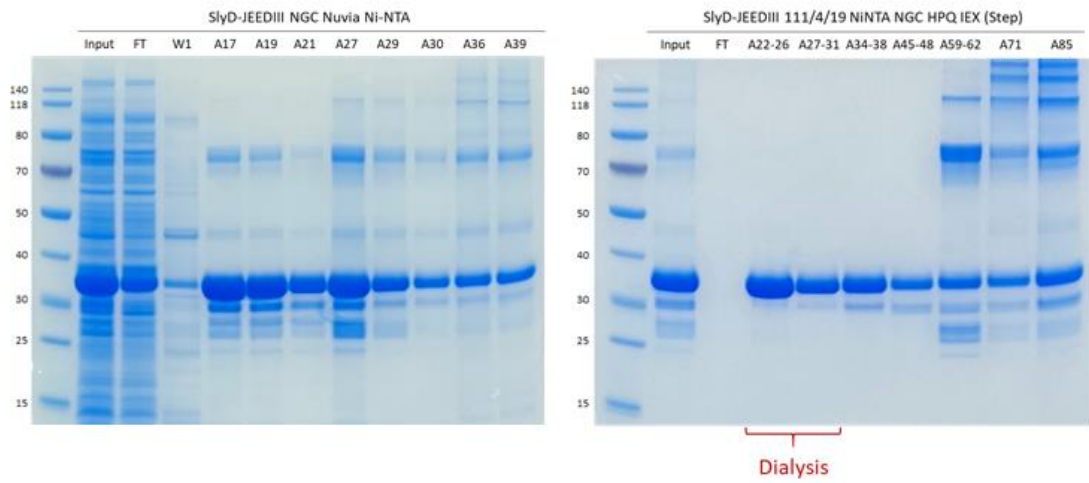


Figure 3 純化 JE EDIII 重組蛋白方法

E.Coli JEEDIII recombinant protein
Ni-NTA / IEX3 Purification



E.Coli JEEDIII recombinant protein
western blot check

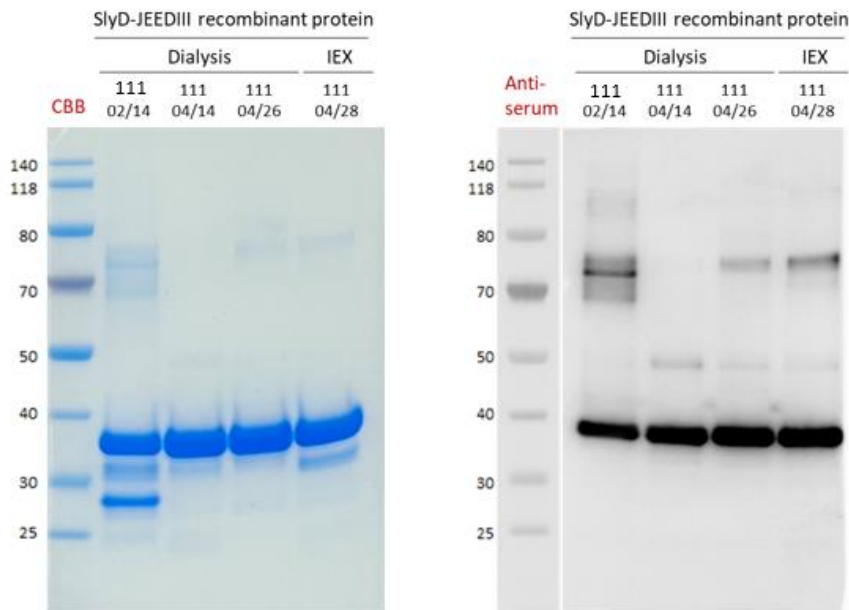
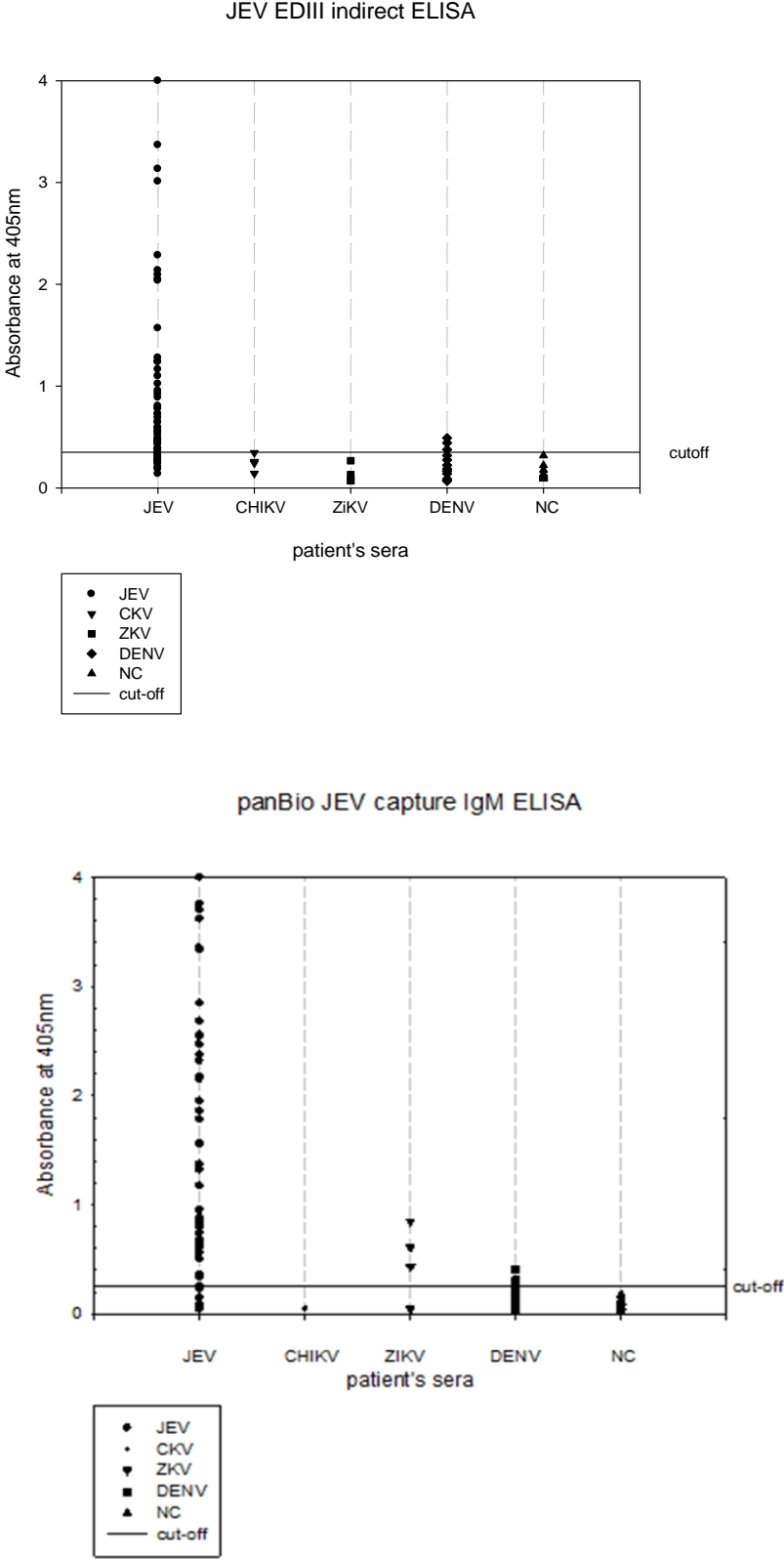
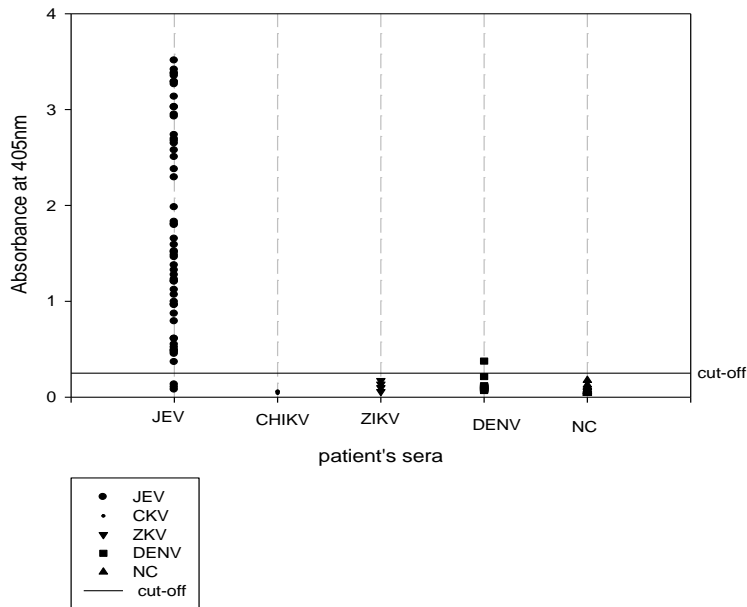


Figure 4 日本腦炎 JE EDIII 重組蛋白酵素免疫分析

(1) 血清檢體檢測



JEV Capture IgM ELISA



(2)不同日本腦炎 IgM 抗體 ELISA 試劑檢測 Genotype I 與 Genotype III 病人血清的日本腦炎抗體之評估比較

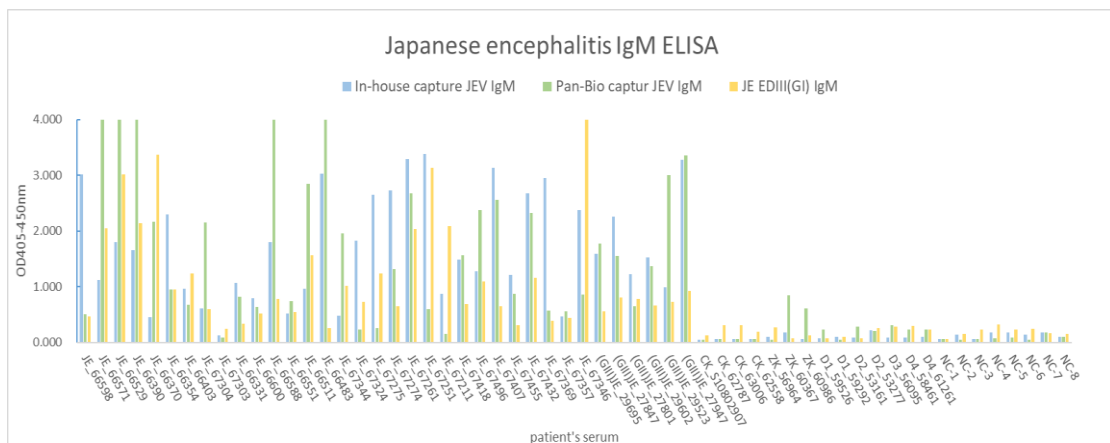


Figure 5 發展日本腦炎病毒抗體 ICT 檢測分析

(1) 自製日本腦炎 IgM/IgG 抗體 ICT



(2) 特異性-交叉反應分析



(3) 陰性檢體品管



(4) 無分析物的品管



Figure 6 自製與市售日本腦炎病毒抗體 ICT 檢測之比較



JEV RDT	66864	58623	58516	58605	58577	58514	58593	58499	58484	58531												
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	+/-	+	+/-	+	+/-	-	+	-	+	-	+/-	-	-	+	+	+/-	+	-	+	-	+	-
SD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	66598	66571	66529	66488	66453	66390	66370	66354	66403	64881												
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	-	+	-	+	+/-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	+	+	ND	ND
	67303	67304	66331	66600	66588	66551	66540	66511	66483	66335												
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
SD	+/-	+/-	-	-	-	-	ND	ND	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	67344	67324	67275	67274	67261	67251	67211	67210	67418	67305												
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
SD	-	+	-	+	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	67187	67496	67407	67455	67439	67432	67369	67357	67365	67346												
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SD	+	-	+	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
	29695	29797	27847	27801	29602	29792	29523	29747	27890													
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Home-made	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Performance of home-made and SD capture ELISA to detect JEV IgM

RDT vs 綜合檢驗結果	N=60	N=30
	JEV capture ELISA	SD JEV capture ELISA
RDT positive	54	21
RDT negative	4	7
Sensitivity (%)	93.1%	72.4%
Specificity (%)	94.4% (85/90)	66.7% (6/9)
Accuracy (%)	93.3%	71.1%

(三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

Figure 1. 低密度 *Wolbachia* 的 C6/36 細胞株 (B and H strain) 在感染茲卡病毒後，不同觀測時間點之相對病毒量。

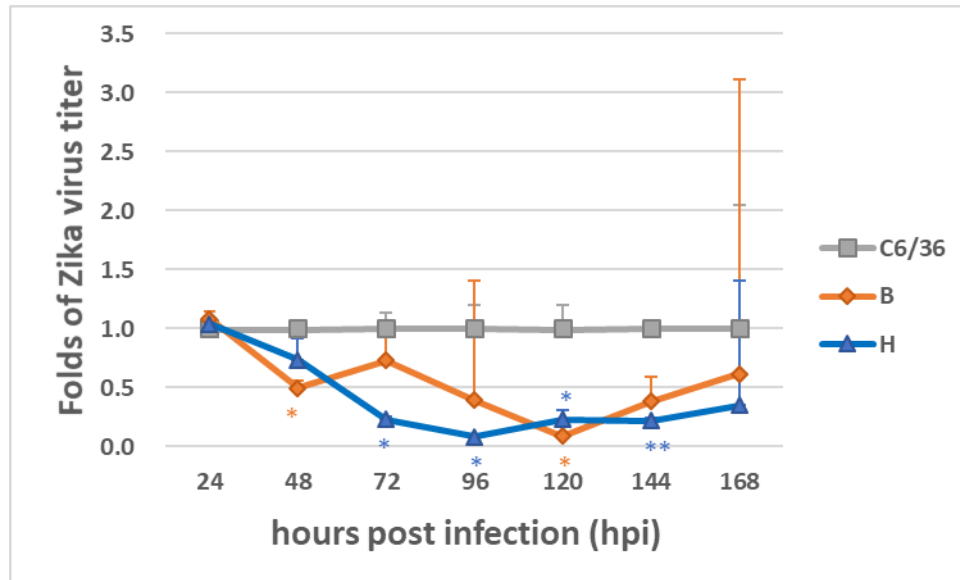


Figure 2. 經四環黴素誘殺 *Wolbachia* 後白線斑蚊子代體內 *Wolbachia* 數量

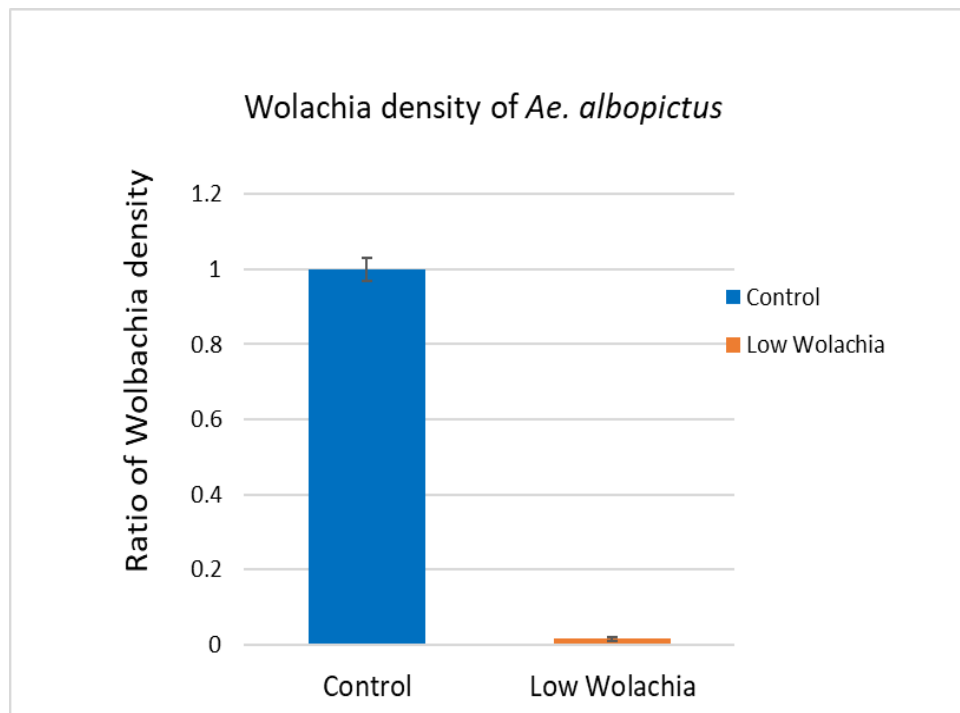


Figure 3. 帶有低密度 *Wolbachia* 白線斑蚊感染茲卡病毒後，白線斑蚊頭部於不同時間點茲卡病毒複製情況。

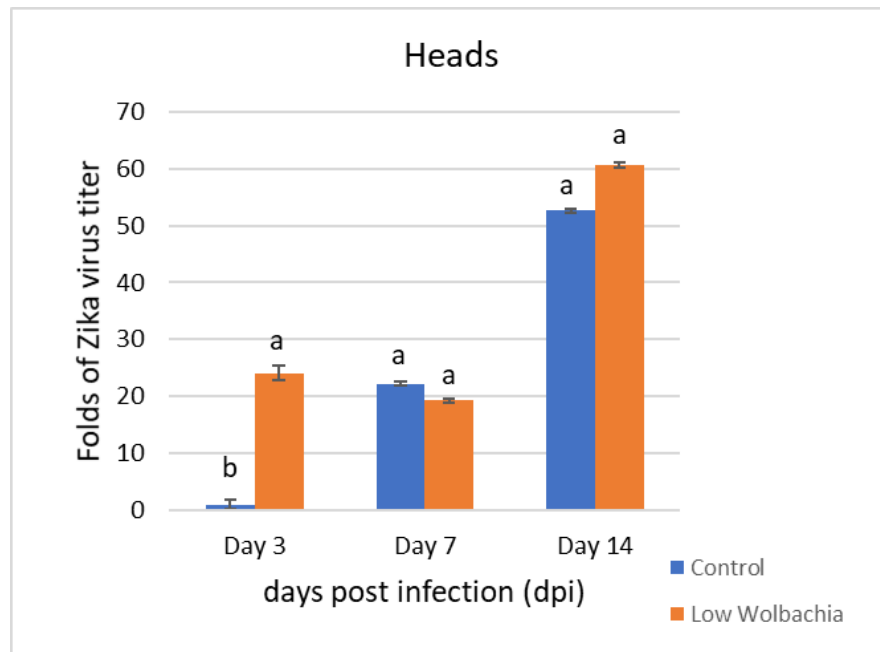


Figure 4. 帶有低密度 *Wolbachia* 白線斑蚊感染茲卡病毒後，白線斑蚊唾腺於不同時間點茲卡病毒複製情況。

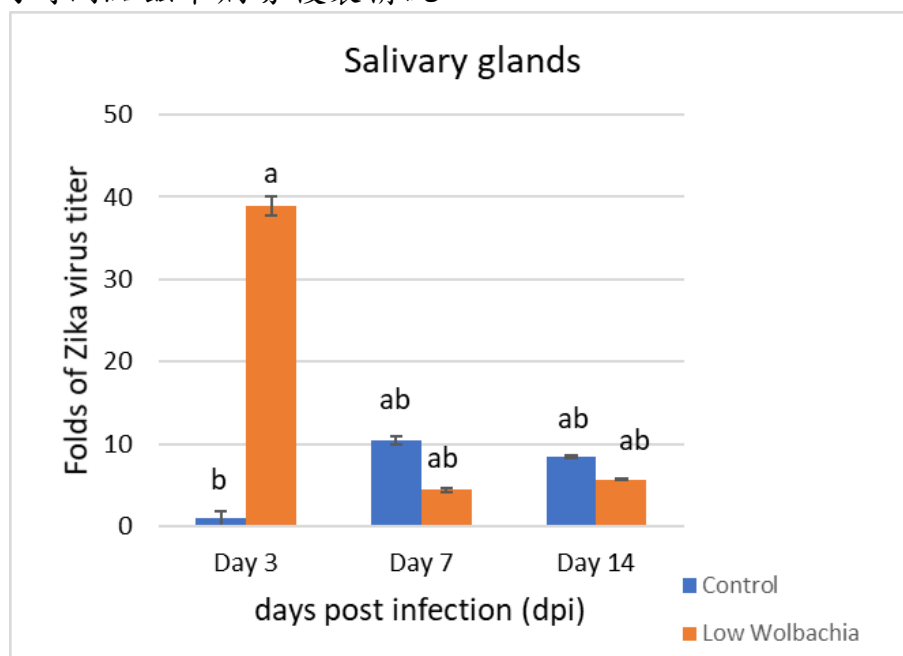


Figure 5. 帶有低密度 *Wolbachia* 白線斑蚊感染茲卡病毒後，白線斑蚊消化道於不同時間點茲卡病毒複製情況。

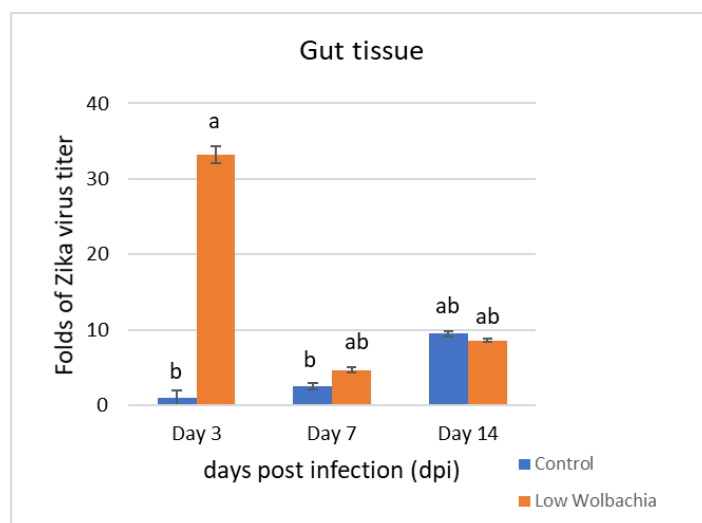


Figure 6. 帶有低密度 *Wolbachia* 白線斑蚊感染茲卡病毒後，白線斑蚊卵巢於不同時間點茲卡病毒複製情況。

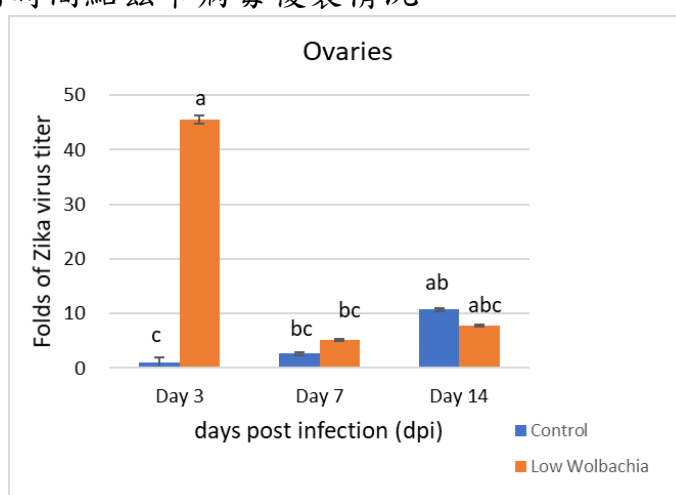


Table 1. 本研究茲卡病毒感染蚊蟲細胞試驗中不同 C6/36 細胞株之 *Wolbachia* 密度

	Real-time PCR (Ct 值)		DNA 濃度 (Log ₁₀)		Relative density
	mRpS6	16S	mRpS6	16S	16S RNA/mRpS6
C6/36	21.82	-	6.60	-	0
B	22.02	35.56	6.55	2.10	0.0000355
H	19.69	37.35	7.19	1.62	0.0000027
<i>Ae. albopictus</i>	26.59	25.45	5.42	4.81	0.245

項 目	本年度核定金額	支 用 狀 況
人事費	2,200,000 元	已支 100%，2,200,000 元
業務費	2,200,000 元	已支 100%，2,200,000 元
總計	4,400,000 元	已支 100%，4,400,000 元

(篇幅不足，請自行複製)

111 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：臺灣病媒性病原之監測及特性分析

計畫主持人：舒佩芸研究員

填報日期：111.11.30

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	研究主題及目標能配合業務需要。	謝謝委員建議與肯定。	無
2	對國內病媒疾病疫情監測具重要性，計畫有其必要。	謝謝委員建議與肯定。	無
3	病媒蚊傳染病監測為常規工作，去年因邊境管制大幅減少，日本腦炎每年約 300 例，確診約 20 例左右。	謝謝委員建議。	無
4	漢他病毒有近百例，十分之一確診，之前確診案例多分佈高雄，現在皆在北部出現，原因為何？	高雄確診個案往年較常分布在 11-4 月之間，今年高雄於 11 月亦有 1 例陽性確診個案。個案可能因工作場域常有鼠類出沒，曾接觸鼠類排泄物，吸入或接觸遭鼠糞尿污染帶有漢他病毒飛揚的塵土、物體，或被帶病毒的嚙齒類動物咬傷，就有感染漢他病毒之虞。	無
5	<i>Wolbachia</i> 部分為疾管署自行辦理，而非國衛院，其進入實際使用防疫的前景為何？	國衛院已完成帶 <i>Wolbachia</i> 埃及斑蚊之特性的半田間試驗，然缺乏 <i>Wolbachia</i> 密度對病原體之評估及野外埃及斑	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
		蚊族群之帶菌情形之結果，本研究結果將提供予國衛院，供其未來進行田間試驗及防治工作之參考。	
6	ELISA 應該測 conserved 與變異抗原，才能達到偵測與分型的目標。	謝謝委員建議，修改後如 Fig4(2)，以 JEDIII 蛋白為基礎的酵素免疫分析試劑對 GI 與 GIII 日本腦炎病毒感染病人血清均能檢測到抗體，同時如 Fig4(1)所示，可與登革熱、屈公及茲卡做出鑑別。	P35, P60
7	<i>Wolbachia</i> 部分應與國衛院類似計畫討論，要能互補。	謝謝委員建議。本研究結果將提供予國衛院蚊媒中心，並討論未來用於田間試驗及防治工作運用。	無
8	P.32 日本腦炎案例縣市分布描述” 病例分布於全國，…” 有誤，建議修改為” 病例分布於全國 11 縣市，主要以…”。	已依委員意見修正。	P32
9	P.50 以後有關通報與確診之分析圖，建議以 epi 常用表示方法，如改以柱狀圖堆疊、並列，較不易誤解。	謝謝委員建議。	無
10	圖表之標題應完整且清楚標示，如年份、區域或全國等。	圖表之標題已依委員建議將標題完整且清楚標示。	P50-55
11	圖 5 地圖，應將圖例說明附註。	已依委員建議將圖例說明附註。	P53

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
12	建議規劃定期將計畫中定序或演化分析結果，鍵入 LIMS 系統等資訊系統，以供監測資訊整合及防治政策參考。	謝謝委員建議，將討論該資料納入 LIMS 系統之可行性，以利整合監測資訊，提供防治政策參考。	無

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 111 年 12 月 23 日前至 GRB 系統完成資料抽換。