

計畫編號：DOH94-DC-2013

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

台灣地區病媒蚊帶病毒監測系統的建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：鄧華真

研究人員：陳健福

執行期間： 94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

世界上節肢病毒約有 500 種，平時在動物間傳播，野生動物常為增幅或病毒維持的宿主。偶而經由病媒蚊傳播給人，再經過另一類病媒蚊，造成人與人間的流行 (Beaty & Marquardt 1996)。目前各種經蚊蟲傳播的疾病有擴散且增多的跡象，例如西尼羅病毒病在美洲的蔓延(White 2001, Estrada-Franco et al. 2003)，洛斯河熱在南太平洋(Russell 1998)，日本腦炎可藉由風力在澳洲蔓延(Kay & Farrow 2000, Johansen et al. 2003)及瘧疾自根除地區再復甦。世界上較重要經蚊蟲傳播的病毒病包括登革熱、日本腦炎、西尼羅病毒病、東方馬腦炎、西方馬腦炎、委內瑞拉馬腦炎、聖路易斯腦炎、La Crosse encephalitis、洛斯河熱、牟谷腦炎等(表一)。除登革熱及日本腦炎外，其它節肢病毒在台灣可能的病媒蚊包括熱帶家蚊、白線斑蚊等常見蚊種。所以必須先建立蚊蟲體內帶病毒檢驗，先瞭解台灣地區潛在性病媒蚊種類，可以增加經蚊蟲傳播疾病的防範。

一個好的病媒性疾病監測系統除了包括人的監測系統外，蚊蟲等病媒監測亦佔很重要的地位，它們可以提供重要病媒種類及其孳生源所在位置、成蟲的活動力及蚊蟲病毒感染率，以預測病媒性疾病發生及防治的參考依據(Moore et al. 1993, Russell 1998, CDC 2003, Spencer et al. 2001, Broom et al. 2003)。在台灣經蚊蟲傳播的重要疾病包括登革熱、日本腦炎、瘧疾等。其中僅有登革熱於 76 年在南部大流行後，開始建立登革熱病媒蚊密度監測計劃，且不定期檢驗病媒蚊體內帶病毒的情形。於民國 91 年於南部地區再度爆發流行後，將蚊蟲體內帶病毒檢驗加入南部重點流行地區病媒蚊監測系統。台灣目前雖然沒有西尼羅病毒，但根據美國的經驗，該病毒於 1999 年自紐約市進入後，即蔓延擴散至全美，加州於 2004 年及 2005 年病例數均達 800 例以上。台灣與加州與紐約州每天有許多直航班機往來，所以應該建立病媒蚊體內西尼羅病毒監測並進行高危險地區檢測。

表一、世界上重要經蚊蟲傳播的節肢病毒及其病媒一覽表(Modified from Beaty & Marquardt, 1996, Moore et al., 1993; CDC, 2003)。

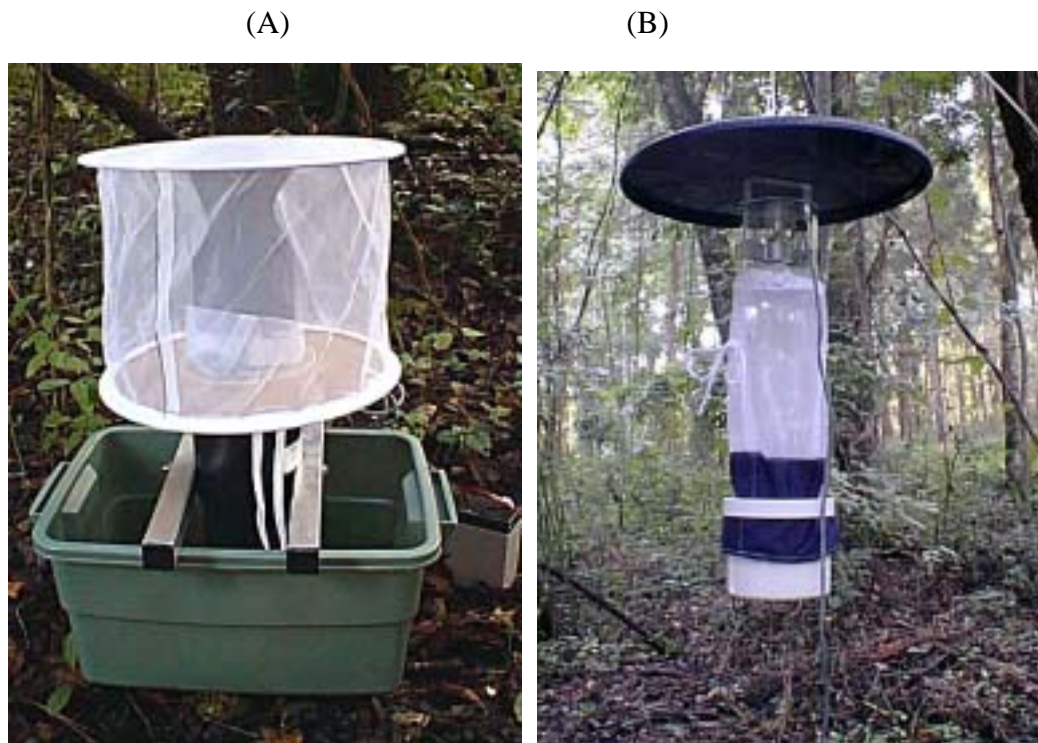
病名	疾病	死亡率	維持環	病媒蚊	台灣潛在性病媒蚊種類
Flaviviridae					
登革熱	出血熱 發燒	3-12% 0%	猴	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes albopictus</i>
日本腦炎	腦炎	30-40%	鳥類	<i>Culex annulirostris</i> <i>Culex gelidus</i> <i>Culex vishinui</i> <i>Culex fuscocephalus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	<i>Culex vishinui</i> <i>Culex fuscocephalus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i>
西尼羅病毒病	發燒	7%(美國)	鳥類	<i>Aedes spp. (4)</i> <i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes triseriatus</i> <i>Aedes vexans</i> <i>Anopheles spp.(6)</i> <i>Coquillettidia sp.(1)</i> <i>Culex spp. (8)</i> <i>Culex pipiens</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes vexans</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Ochlerotatus dorsalis</i> <i>Ochlerotatus japonicus</i>

				<i>Culex restuans</i> <i>Culex salinarius</i> <i>Culex tarsalis</i> <i>Culex nigripalpus</i> <i>Dinocerites sp.(1)</i> <i>Ochlerotatus spp.(15)</i> <i>Culiseta spp. (2)</i> <i>Orthopodomyia sp.(1)</i> <i>Psorophora spp. (4)</i> <i>Uranotaenia sp.(1)</i>	
聖路易斯腦炎	腦炎	4-20%	鳥類	<i>Culex restuans</i> <i>Culex salinarius</i> <i>Culex nigripalpus</i> <i>Culex pipiens complex</i> <i>Culex tarsalis</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
牟谷腦炎	腦炎	20-70%	鳥類	<i>Culex annulirostris</i>	
黃熱病	出血	5-20%	猴	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes africanus</i> <i>Aedes simpsoni</i> <i>Haemagogus spp.</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<hr/>					
Togaviridae					
東方馬腦炎	腦炎	50-75%	鳥類	<i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes canadensis</i> <i>Aedes sollicitans</i> <i>Aedes vexans</i> <i>Coquillettidia perturbans</i> <i>Culex nigripalpus</i> <i>Culex salinarius</i> <i>Culisera melanura</i>	<i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes vexans</i>
西方馬腦炎	腦炎	5-10%	野鳥	<i>Aedes melanimon</i> <i>Culex tarsalis</i>	
委內瑞拉馬腦炎	腦炎	0.1-20%	鼠類	<i>Aedes taeniorhynchus</i> <i>Culex spp.(30).</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
洛斯河熱	發燒	0%	袋鼠、牛及狗	<i>Culex annulirostris</i> <i>Ochlerotatus(Ae.) vigilax</i> <i>Aedes procax</i> <i>Aedes funereus</i>	<i>Ochlerotatus vigilax</i>
屈公病	出血熱發燒	稀少	猴	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<hr/>					
Bunyaviridae					
La Crosse encephalitis	腦炎	1%	Small mammals (例如花栗鼠 <i>Tamias striatus</i> )	<i>Aedes Canadensis</i> <i>Aedes communis</i> <i>Aedes dorsalis</i> <i>Aedes melanimon</i> <i>Aedes stimulans</i> <i>Aedes triseriatus</i> <i>Culiseta inornata</i>	
裂谷熱	發燒	0%	牛羊駱駝	<i>Floodwater Aedes spp</i> <i>Culex pipiens.</i>	<i>Culex quinquefasciatus?</i>

## 材料與方法

參考疾病管制局人體檢體西尼羅檢測方法(舒佩芸博士提供), 先於實驗室建立病媒蚊體內西尼羅病毒 Real time RT-PCR 檢驗方法, 內含陽性對照組、 Primers

的選定及敏感度測試。另外利用特別設計捕捉懷孕雌蚊的誘蚊器(圖一 A)及搜尋寄主的誘蚊燈(圖一 B) 外加乾冰於西尼羅病毒潛在危險地區,例如台北近郊候鳥棲息地區(例如關渡自然公園及木柵動物園) 台南縣七股黑面琵鷺保護區、中正機場、山區等懸掛一晚,於下午 18:00 至第二天早上 8:00 左右,採集到的雌蚊放入裝有碎冰/乾冰的冰桶,帶回實驗室依據台灣蚊種檢索(連日清, 2004)鑑定至種類,將同地區同種類同日所採集到的蚊蟲,至多 50 隻當作一池,進行西尼羅病毒檢驗。



圖一、蚊蟲採集器(A)Reiter CDC gravid trap for *Culex* mosquitoes (B)CDC miniature.

## 結果

### 一、病媒蚊體內西尼羅病毒檢測方法

#### (一)抽病媒蚊病毒 RNA (使用 Qiagen miniviral RNA kit)

1. 將約 1-50 隻蚊子放入 1.5 ml 微量試管中,加入 0.5ml BA-1 溶液,並放入 1 顆滅菌過的玻璃珠。
2. 以 tissue lyser 震盪 1 分鐘打碎蚊蟲細胞組織。
3. 將均質液,以 14000rpm 離心 10 分鐘除去懸浮固體。
4. 取 100  $\mu$ l 上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中,並加入 150  $\mu$ l BA-1 溶液,混和均勻。
5. 吸取 560  $\mu$ l 含有 carrier RNA 的 AVL 溶液至 1.5ml 微量離心管中,並加入 140  $\mu$ l 步驟 4 的液體,vortex 1 分鐘混合均勻。
6. 室溫(15 ~ 25 )下作用 10 分鐘。
7. 加入純酒精 560  $\mu$ l,震盪約一分鐘以終止反應。

8. 利用小烏龜離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。
9. 將上述混合液 630  $\mu$ l 分兩次加至 QIAamp spin column (放置於 2ml collection tube 上)，蓋上蓋子，以 14000 rpm 轉速離心 2 分鐘，將 QIAamp spin column 放置新的 2ml collection tube 上。
10. 小心打開 QIAamp spin column 的蓋子，加入 500  $\mu$ l AW 1 溶液，蓋上蓋子，以 14000rpm 轉速離心 2 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  $\mu$ l AW 2 溶液，蓋上蓋子，以 14000 rpm 轉速離心 2 分鐘，倒去下層液。
12. 將 QIAamp spin column 放置新的 1.5ml 微量離心管上，以 14000rpm 轉速離心 3 分鐘後，開蓋放置室溫中 5 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 AVE 70  $\mu$ l 溶液，靜置於室溫下 10 分鐘，以 14000rpm 轉速離心 2 分鐘。
14. 保存於 -20 或 -70

(二)以 real-time PCR 實驗方法測病媒蚊帶西尼羅病毒

1. 取出 Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Cat NO.204243)內的 Master Mix 及 RNase-free waer 測西尼羅病毒專用的 primers(疾病管制局病毒一實驗室舒佩芸博士提供)，待溶解後離心 (spin-down)，立即置於冰上。
2. 依序加入以下試劑(全程於冰上操作)：

Component	體積	最後濃度
RNase-free water	13.5 $\mu$ l	
Foward primer	0.5 $\mu$ l	
R139 WN-F2 GAT GGA GAG GTG TGA ACA AAC AAA CAG C		
Reverse primer	0.5 $\mu$ l	
R140 WN-R2 CAT CAC T/CTT CCC TTG GAA GTT AGA GAG GG		
R141 WN-R3 CTA CAA CTT TCC TTG AAA GTT TGA CAG GGT		
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Maser Mix	25.0 $\mu$ l	1X
QuantiTect RT Mix	0.5 $\mu$ l	
總計	40.0 $\mu$ l	

\*配製時多加一份的量。

3. 加入 40  $\mu$ l Master MiX 至 Q-PCR 專用試管。
4. 加入檢體、陽性、陰性對組 RNA。
  - 蚊子檢體：取 10  $\mu$ l
  - 陽性對照組：病毒 RNA 稀釋 10 倍後，加 10  $\mu$ l
  - 陰性對照組一：NTC (Non-Template Control)，加 10  $\mu$ l RNase-free water
  - 陰性對照組二：陰性純化出之 RNA，加 10  $\mu$ l
5. 蓋上 Q-PCR 專用試管蓋子，輕輕搖晃混和均勻，離心 (spin down)。
6. 用 MX4000 進行反應及分析結果。

## 溫度程式

步驟	循環	時間	溫度
Reverse Transcription	1	30 min	50
PCR Initial Activation	1	15 min	95
Denaturation	45	15 sec	94
Annealing	45	30 sec	55
Extension	45	20 sec	72
	45	30 sec	77
Dissociation Curve	1	1 min	95
	45		0.5 /cycle/ 30sec
			68

## 二、敏感度測試

94 年度利用 real time RT-PCR 建立西尼羅病毒檢驗流程(含陽性對照及陰性對照)，可測病毒濃度至少 0.0012 PFU/ml (表二)。

表二、西尼羅病毒敏感性測試。

Well	病毒濃度(PFU/ml)	Ct	Tm	Final Call
A11	1.20E+07	12.13	83.75	+
B11	1.20E+06	16.71	82.75	+
C11	1.20E+05	21.40	82.75	+
D11	1.20E+04	26.21	82.75	+
E11	1.20E+03	28.77	82.75	+
F11	1.20E+02	29.37	82.75	+
G11	1.20E+01	30.35	82.75	+
H11	1.20E+00	29.31	82.75	+
A12	1.20E-01	28.85	82.75	+
B12	1.20E-02	28.88	82.75	+
C12	1.20E-03	29.91	82.75	+
D12	ddH <sub>2</sub> O	No Ct	75.25	-

## 三、野外族群檢測

截至目前為止，共前往山區村莊、關渡自然公園、木柵動物園及七股野鳥保護區等野鳥及候鳥聚集的區域採集，共檢測 933 隻蚊蟲 127 池，其中熱帶家蚊 57 隻、三斑家蚊 212 隻、環紋家蚊 47 隻、鹹水家蚊 182 隻、白線斑蚊 126 隻、白腹叢蚊 242 隻及其他蚊種 44 隻，結果均為陰性(表三)。

表三、94 年野外蚊蟲體內帶西尼羅病毒檢驗結果。

蚊蟲種類	村莊		關渡自然公園		木柵動物園		七股野鳥保護區		機場		合計		檢驗結果
	隻數	池數	隻數	池數	隻數	池數	隻數	池數	隻數	池數	隻數	池數	
熱帶家蚊	13	5	10	6	2	1	32	6	8	5	65	23	陰性
三斑家蚊	8	2	196	9	6	3	2	2	6	3	218	19	陰性

環紋家蚊	0	0	43	5	0	0	4	2	0	0	47	7	陰性
二斑家蚊	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3	2	陰性
雙角家蚊	0	0	0	0	2	2	0	0	1	1	3	3	陰性
林氏家蚊	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	陰性
莫氏家蚊	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	陰性
黑點家蚊	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	陰性
灰胸家蚊	0	0	0	0	11	7	0	0	0	0	11	7	陰性
鹹水家蚊	0	0	0	0	0	0	182	8	0	0	182	8	陰性
白線斑蚊	175	9	8	3	54	9	5	4	7	5	249	30	陰性
馬氏斑蚊	0	0	0	0	5	2	0	0	0	0	5	2	陰性
白肋斑蚊	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	陰性
白腹叢蚊	124	10	0	0	2	2	0	0	0	0	126	12	陰性
河床瘧蚊	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	陰性
多斑瘧蚊	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	陰性
斑腳沼蚊	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4	陰性
竹生翠蚊	0	0	0	0	6	3	0	0	0	0	6	3	陰性
蛛形翠蚊	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	陰性
合 計	328	28	263	28	93	33	226	23	23	15	933	127	陰性

## 討論

此計畫已建立蚊蟲體內帶西尼羅病毒檢驗系統，敏感度可檢測病毒濃度至少 0.0012 PFU/ml，並初步檢測野外蚊蟲，雖然目前檢驗均為陰性，但因採獲的常見蚊蟲種類包括三斑家蚊、熱帶家蚊、白線斑蚊、環紋家蚊等西尼羅病毒的潛在病媒蚊，且樣本數太少，所以宜增加樣本數，進行大量篩檢，持續進行西尼羅病毒監測。

台灣地區尖音家蚊群有兩種，熱帶家蚊及地下家蚊，雖然種類鑑定表建議可使用形態區分：腹部的淡斑及亞前緣脈，但實際執行上確有困難，因為有可能有雜交現象，導致形態不明顯，應比照姊妹種的方式建立分子生物鑑定方法區別。

為了自蚊蟲體內檢驗出西尼羅病毒，一般建議使用 CDC 誘蚊燈及孕母誘集器，但前者使用燈管的誘蚊效果不一(Mcnelly 1989)，而後者須使用誘引劑誘引蚊蟲前來產卵，所以仍需進一步研究或釐清適合於台灣地區蚊蟲的補蚊器具及條件。

## 結論與建議

- 一、在野鳥等西尼羅病毒潛在危險地區，仍可採獲大量潛在西尼羅病媒蚊，所以應持續進行監測。
- 二、因為尖音家蚊群的形態類似，且有雜交現象，所以應建立台灣地區尖音家蚊群的分子生物鑑定技術。

## 參考文獻

- 連日清。臺灣蚊種檢索。藝軒圖書出版社，2004。
- Beaty BJ, and Marquardt WC. 1996. The biology of disease vectors. The University Press of Colorado, Colorado, USA, 85-97pp.
- Boom AK, Lindsay MD, Wright AE, Smith DW, Mackenzie JS. 2003. Epizootic activity of Murray Valley encephalitis and Kunjin viruses in an aboriginal

- community in the southeast Kimberley region of Western Australia: results of mosquito fauna and virus isolation studies. *Amer. J. Trop. Med. & Hygiene* 69: 277-283.
- Center for Disease Control. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for surveillance, prevention, and control. 2003, 75pp.
- Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DWC, Coffey L, Carrara AS, Da Rosa AT, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortes AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett ADT, Weaver SC. 2003. West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerging Infectious Diseases* 9:1604-1607.
- Johansen CA, Nisbet DJ, Zborowski P, van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Flavivirus isolations from mosquitoes collected from western Cape York Peninsula, Australia, 1999-2000. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 19:392-396.
- Kay BH, and Farrow RA. 2000. Mosquito (Diptera:Culicidae) dispersal: implications from the epidemiology of Japanese and Murray Valley Encephalitis Viruses in Australia. *J. Med. Entomol.* 37: 797-801.
- Mcnelly JR. 1989. The CDC trap as a special monitoring tool. Proceedings of the Seventy-Sixth Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association, Inc. 1989, pp 26-33.
- Moore CG, Mclean RG, Mitchell CJ, Nasci RS, Tsai TF, Calisher CH, Marfin AA, Moore PS, Gubler DJ. 1993. Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. CDC. 81 pp.
- Russell, RC. 1998. Vectors vs. human in Australia-who is on top down under? An update on vector-borne disease and research on vectors in Australia. *J. Vector Eco.* 23:1-46.
- Spencer JD, Azoulas J, Broom AK, Buick TD, Currie B, Daniels PW, Doggett SL, Hapgood GD, Jarrett PJ, Lindsay MD, Lloyd G, Mackenzie JS, Merianos A, Moran RJ, Ritchie SA, Russell RC, Smith DW, Stenhouse FO, Whelan PI. 2001. Murray valley encephalitis virus surveillance and control initiatives in Australia. National Arbovirus Advisory Committee of the Communicable Diseases Network Australia. *Communicable Diseases Intelligence* 25:33-47.
- White DJ, Kramer LD, Backenson PB, Lukacik G, Johnson G, Oliver J, Howard JJ, Means RG, Eidson M, Gotham I, Kulasekera V, Campbell S. Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of West Nile virus, New York State. *Emerging Infectious Diseases* 7:643-649, 2001.