計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-113107

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

# 台灣病媒性病原之監測與特性分析

## 年度研究報告

執行單位：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

研究人員：蘇千玲、楊正芬、張梅君、楊凱蓉、楊素鈴、鍾瀚璿、王建程、朱美蓮

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

# 目錄


頁碼

封面

目錄

壹、摘要

一、中文摘要 3

二、英文摘要 5

貳、本文

一、前言 8

二、材料與方法 18

三、結果 29

四、討論 36

五、結論與建議 42

六、重要研究成果及具體建議 44

七、參考文獻 46

八、圖、表 53


共 (82)頁

**中文摘要**

2020 年 1/1~10/31 共偵測出 3 例境外移入屈公病病例，分別來自馬來西亞、泰國及印尼。共分離出 2 株屈公病毒株(馬來西亞及泰國)，皆屬於 East-Central-South African genotype。偵測出 2 例境外移入茲卡病毒感染病例，來自泰國及馬來西亞。2020 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)的確定病例數降低。

日本腦炎是台灣的地方性傳染病，2020 年至 10/31 共偵測出 21 例日本腦炎病例。病例分布以桃園市(4 例)、新北市、南投縣及屏東縣各 3 例為多。7-8 月間於關渡自然公園採集 3,471 隻病媒蚊，分為 78 池，其中 1 池日本腦炎病毒(JEV) PCR 陽性，屬於 genotype I，1 池 Tembusu virus PCR 陽性。漢他病毒感染症是台灣的地方性傳染病，2020 年至 10/31 共偵測出 11 例漢他病毒感染症病例，為歷年最多，其中高雄市 5 例及屏東縣 3 例最多。PCR 陽性有 5 例，定序結果皆屬於首爾病毒(Seoul virus; SEOV)。

登革熱、屈公與茲卡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應用開發以酵素免疫分析法及免疫色層分析法（Immunochromatographic test; ICT）為基礎的結合茲卡、登革熱及屈公病等 arbovirus 整合型抗體快速檢測試劑及登革熱、屈公熱抗原抗體快速檢測及日本腦炎快速檢驗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、日本腦炎病毒、茲卡病毒及屈公病毒，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、節肢病毒、沃爾巴克氏菌

## 英文摘要

Between January 1 and October 31, 2020, a total of 3 cases of imported chikungunya disease were identified. These cases arrived from Malaysia, Thailand and Indonesia, respectively. There were 2 imported cases of Zika virus infection, they arrived from Thailand and Malaysia. A total of 2 chikungunya virus strains (Malaysia and Thailand) were isolated, all of which belonged to the East-Central-South African genotype. Affected by the COVID-19 pandemic in 2020, border control measures have been implemented to reduce the number of imported cases of vector-borne viral infectious diseases (such as dengue and chikungunya).

Japanese encephalitis is an endemic disease in Taiwan. A total of 21 cases of Japanese encephalitis have been detected in 2020. There were 4 cases in Taoyuan City, 3 cases each in New Taipei City, Nantou County and Pingtung County. Mosquitoes were collected in Guandu Nature Park during July-August, 2020. A totle of 3,471 mosquitoes were collected and divided into 78 pools. Among them, 1 pool was Japanese encephalitis virus (JEV) PCR positive, belonging to genotype I, and 1 pool was Tembusu virus PCR positive.

Hantavirus infection is an endemic infectious disease in Taiwan. A total of 11 cases of Hantavirus infection have been detected in 2020. Among them, 5 cases live in Kaohsiung City and 3 cases in Pingtung County. A total of 5 PCR positive cases were identified and all belonged to Seoul virus (SEOV).

As the international close commercial link, modern transportation, and the impact of global warming, vector-borne infectious diseases have gradually invaded to new geographic territories and the number of cases

has also increased rapidly. 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 Zika, Dengue 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 relay 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 trail 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, Japanese encephalitis virus, zika virus and chikungunya 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. arthrovirus, *Wolbachia*,

## 一、前言

### （一）、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

茲卡病毒感染症、屈公病及日本腦炎為重要的病媒病毒傳染病(http://www.who.int/)。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（1）。 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 (2-4)，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 (5)。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，成人的神經系統可能也因感染茲卡病毒導致異常(6)。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 (7)。

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（8）。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(*Culextritaeniorhynchus*)；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（9）。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（10-11）。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。

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 （12-14），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（15-18）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（19），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 (11, 20)。本計畫持續日本腦炎病媒蚊監測，探討本土流行的病毒之遺傳學和抗原性變化，建立基因資料庫及流行病學基本資料，提供疫苗評估及開發之參考。

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(21)。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(22)。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(23-24)，2019 年首次發現有本土病例，流行於新北市土城及中和區。

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(25)。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)、家鼷鼠(Mus musculus)與赤背條鼠(Apodemus agrarius)，以及食蟲目的錢鼠(Suncus murinus) (26-27)等，其中溝鼠、亞洲家鼠、家鼷鼠及錢鼠喜愛居住於人類活動（屋宅等）之環境區域。 臺灣近十年漢他病毒感染病例數並不多，絕多數為散發病例 (28)。

本計畫建置之茲卡、日本腦炎、屈公及漢他病毒基因資料庫，將有助於了解這些病毒在台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**

主要工作目標：應用以酵素免疫分析法及免疫色層分析法為技術基礎，分析開發的茲卡病毒、登革熱及屈公病等 arbovirus 整合型抗體快速檢測試劑、結合屈公抗原及抗體 ICT 檢測試劑與結合登革熱 NS1 分型抗原、抗體的 ICT 檢測試劑，可分別在病人的急性期、後急性期或恢復期檢體中，快速的診斷出傳染病的種類，期望將來可運用於機場發燒篩檢及醫療院所同時進行茲卡病毒、登革熱及屈公病篩檢，降低對國內病媒蚊傳染疾病疫情的衝擊，這診斷與監測系統將有助於茲卡、屈公病等的防治工作。

主要工作項目：(1)分析登革熱及屈公病抗體快速診斷系統的靈敏度與專一性; (2) 組裝登革熱 、屈公熱結合抗原及抗體的快速診斷系統，並分析其靈敏度與專一性;並與其他試劑做比較。預期績效：本計畫發展的快速檢測試劑，能提升檢驗技術、增進傳染病檢驗量能及節約檢驗經費，並使來源也不虞匱乏。最重要是能幫助快速檢測出傳染病種類，及早實施防疫工作，對有助於傳染病的防治工作。

目前實驗室診茲卡、登革熱及屈公病的檢驗方法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（immunoflouorescent 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。

本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。

應用免疫色層分析法技術發展出的快速檢測試劑最早出現於 1988 年的驗孕試劑。至今已有許多不同的檢測試劑發展出來，如藥物、農藥、醫學、傳染病等檢測。

快速免疫色層分析法常用於傳染病病原體蛋白質抗原或抗體的檢測，其原理如下：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，各種元件組裝切割後即完成。其測試原理與一般免疫分析法相同，但檢測方法非常簡單，只需將檢體滴入檢測試劑上，幾分鐘內即可獲得結果。目前市面已售之傳染病快速檢測試劑包括 Influenza virus、AIV、SARS、Dengue virus、Adenovirus、Epstein-Barr virus、HBV、HIV、M. tuberculosis 等。因為 ELISA 方法與快速免疫色層分析法之基本原理相似，所以可以利用 ELISA 方法來篩選免疫色層分析法的所需的試劑，並評估其靈敏度及專一性。由於高靈敏度及專一性的快速診斷試劑，一直是大家所努力與希望達成的目標與趨勢，故有必要儘速發展傳染病之快速診斷試劑。

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加。茲卡、屈公病及黃病毒屬病毒，是台灣地區最重要的病媒性傳染病，近年來病例都有持續增加的趨勢。早期通報、早期診斷、早期治療與早期防治是病媒性傳染病的重要防治策略與方法。透過各種監測系統，加強發燒病患通報，快速檢驗，即時掌握急性期感染的確定病例，可有效防止病毒藉由病媒蚊的傳播而蔓延，有利於疫情的及時監測與緊急防治措施。

應用免疫色層分析法為基礎的快速檢測試劑，其最大的優點是不需特殊的儀器，操作簡便，能迅速得到檢測結果。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。

### (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，而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）的傳染病的風險不斷增加[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 年亦有 100 個本土病例，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 108 年破冰，累計通報 21 個本土病例，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。

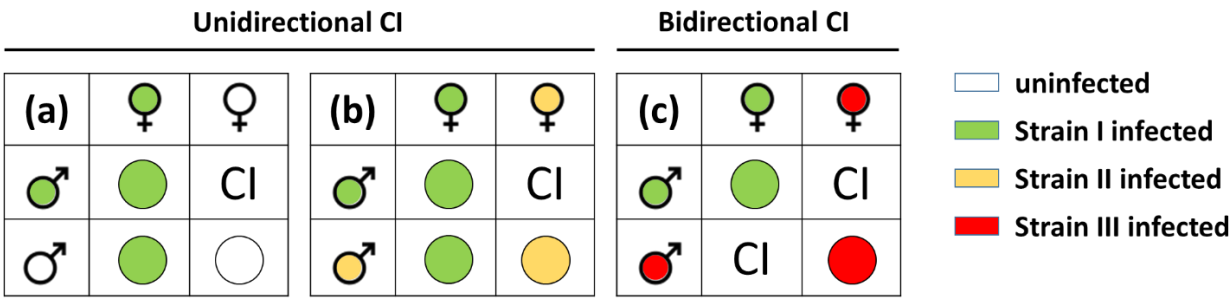
近年來利用釋放蚊蟲作為防治策略的有基因改造蚊蟲及帶 *Wolbachia* 的蚊蟲，其中又以後者對環境較為友善。*Wolbachia* 是立克次體目（Rickettsiales）歸於 a-變形菌屬（a-proteobacteria）的一種母系遺傳的絕對細胞內共生菌，而根據研究指出 *Wolbachia* 存在於超過一百萬種(>65%)的昆蟲體內，是目前所知最廣泛的細胞內共生菌。此菌截止至 2020 年已經分類出除去 G 以外的 A~S 共 18 個超群 （supergroup），其中以 supergroup A、B 於昆蟲中較為常見。感染 *Wolbachia* 的昆蟲在生殖演化上具有優勢地位，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]。

*Wolbachia* 在細胞研究中顯示能有效抑制登革病毒量[16]。有些種類的蟲媒可以自然感染 *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* 的情形，例如埃及斑蚊。已經有研究結果顯示利用人工感染（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[17]，並抑制病媒蚊密度。Moreira 等人指出將埃及斑蚊感染 *Wolbachia* 能透過調節昆蟲免疫反應及競爭資源，抑制登革病毒及屈公病毒的複製，而茲卡病毒在其他研究也有相似的結果[18-20]，而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，白線斑蚊感染的 wAlbA 及 wAlbB 對於抑制登革病毒及屈公病毒是沒有效的[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]。初步認為是跟

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。

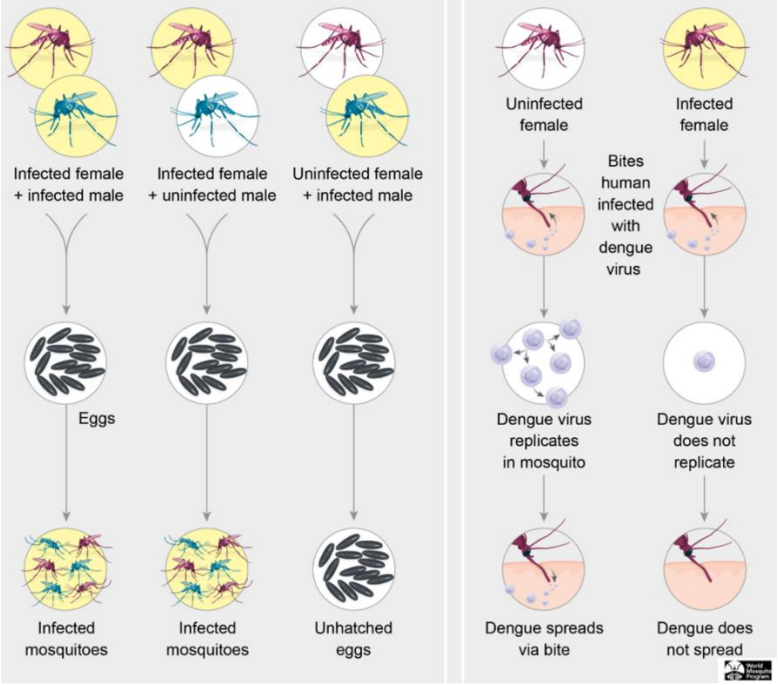
將 *Wolbachia* 應用在病媒蚊防治上的構想有二種，分別為族群抑制策略（reduction strategy）及族群取代策略（replacement strategy）。族群抑制策略目前有中國及新加坡採用此種方法，主要透過釋放帶有 *Wolbachia* 的雄蚊，讓帶有 *Wolbachia* 的雄蚊與野外雌蚊交配後，因細胞間質不相容，其卵無法孵化(下圖 A-a)，再依其雌雄互相交叉（reciprocal crosses）所產生子代的情形，分成單向細胞間質不相容（圖 A-b）及雙向細胞間質不相容（圖 A-c） [14]，進一步使得野外族群的密度降低，最終藉由降低病媒蚊族群密度達到疾病防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

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]。Tsai 等人報導，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，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 pipientis* 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*（至少 2 種）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（茲卡病毒及屈公病毒），以提供國內病媒性疾病防治政策參考。

## 二、材料與方法

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. 病媒蚊採集：在流行季節採集病媒蚊，是最有效的分離日本腦炎病毒的方法，步驟如下：
   (1) 5-7 月每周調查採集 1-2 次，選擇台灣北、中、南、東各地緊鄰水稻田之養豬戶、公園、養鴿戶及溼地等，以人工掃網或乾冰掛網方式採集病媒蚊。
   (2) 人工掃網採集時間在下午 6-9 時，乾冰掛網方式採集時間在下午 6 時至隔日清晨，採集到的病媒蚊放入一般紙杯中帶回實驗室，分類及記錄採獲蚊子數。已吸血之雌蚊，在 25℃下，以 10%糖水餵食 5 天。
   (3) 捕獲之蚊蟲，依種類、性別、地點、日期，每 50 隻集合成 1 池(pool)。將蚊子 pool 使用組織溶解器(tissue lyser II, Qiagen, Hilden, Germany)研磨，每 1 pool 蚊子混合在 500 μL 緩衝液中研磨均質化，再離心得到上清液，取上清液進行 RNA 抽取及 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒及其他病媒病毒陽性檢體。
4. 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，可以選擇性的與核醣核酸結合，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 μL，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 µl 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。

5. 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 TGTCCYGGTCTTCCT。(4)Hantavirus-specific primers.
6. 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(29)：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 µl 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 µl QuantiTect RT Mix，最後加入 10 µl 檢體 RNA，反應最終體積為 50 µl。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50ºC RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95ºC 15 分鐘，45 次循環之 94ºC 15 秒、55ºC 30 秒、72ºC 20 秒、77ºC 30 秒。
7. 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。
8. 基因重組蛋白之製備與純化：
   (1) 基因重組蛋白質之製備：登革熱膜蛋白，及屈公病毒（CHIKV）膜蛋白 E2 (i)利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段，並於 5'端與 3'端加上 Bam HI 及 Hind III 限制酶切位，將此

DNA 片段利用限制酶選殖至昆蟲細胞桿狀病毒載體表現載體上，此表現系統是利用昆蟲桿狀病毒 (baculovirus) 作為外源基因的載體，帶有重組基因的桿狀病毒感染昆蟲細胞可生產大量的重組蛋白。因昆蟲細胞為真核細胞，在表現蛋白後會進行轉譯後修飾，因此可用來生產醣蛋白。並具有產量高，基因產物不論是原核或真核細胞，或是病毒皆可表現的優點，此系統常應用在疫苗生產或生物製藥。本實驗所使用的昆蟲細胞 Sf-21 是購自 Clontech 公司，昆蟲細胞-桿狀病毒載體表現系統是採用 Bac-to-Bac Baculovirus expression system (Invitrogen)，使用 RT-PCR 法大量複製茲卡病毒 ZIKV、日本腦炎 JEV、屈公病 CHIKV 的膜蛋白 (envelope) 基因序列，以限制酶選殖法將膜蛋白基因接在 pFastBac 載體上，送至明欣生物科技公司定序，確認接到載體上的基因正確無誤後，以轉型作用 (transformation) 送入 DH10Bac *E.coli* 勝任細胞 (Invitrogen)。將勝任細胞塗抹在含有 50μg/ml kanamycin 、10μg/ml tetracycline、7μg/ml gentamycin、100μg/ml Bluo-gal、40μg/ml IPTG 的固態培養基，以鋁箔紙包覆放入 37℃ 培養箱 48 小時，挑選單一白色菌落，以 Pure Link HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit (Invitrogen)抽取純化 DH10Bac 內的重組 Bacmid DNA，使用 M13 引子進行 PCR 鑑定 DNA 長度，成功重組的 bacmid 之 PCR 產物為 2.3 kb 與插入外來基因的總和，沒有重組的則為 300 bp。取 1μg 重組 bacmid 與 10μl Cellfectin II (Invitrogen) 和 0.5 ml Grace's medium 震盪混和，靜置室溫 1 小時後加入 $8\times10^5$ Sf-21 細胞，在 27℃培養 5 小時，之後加入 2 ml 含有胎牛血清的 X-press medium (clontech) 取代原本

的混和液，繼續培養 96 小時。收取上清液即為第一代重組病毒液 (P1 baculovirus stock)。取 500ul 重組病毒液感染 2 ×10 $^{6}$ Sf-21 細胞，在 27℃培養 96 小時，收取上清液即為第二代重組病毒液 (P2 baculovirus stock)。此動作可增加重組病毒的力價。使用 BacPAK qPCR Titration Kit (clontech) 計算重組桿狀病毒力價，步驟為取 200ul 重組病毒液，以 NucleoSpin® Virus Kit 純化重組病毒 DNA，之後將 BacPak 引子、ROX 螢光染劑、酵素混和後以 qPCR 測定，得到的讀值將與已知力價的標準品 baculovirus 作比較，得到重組桿狀病毒力價。取 MOI = 10 的重組桿狀病毒感染 6 ×10$^{6}$ Sf-21 昆蟲細胞，在 27℃ 培養 72 小時，之後將感染後的細胞與培養基收集在 50 ml 離心管，離心 3500 rpm、30 分鐘，分離出上清液 (培養基) 與細胞，以 SDS-PAGE 和 Western blot 分析重組蛋白的表現情形。(ii) 利用大腸桿菌( Escherichia coli ) 可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點 ( Gold, 1990 )，採用大腸桿菌 ( Escherichia coli ) 表現重組蛋白質。首先利用 RT-PCR 或 PCR 得到蛋白質的 DNA 片段。將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產生 N 端（或 C 端）為 His-tag 的全長 424a.a. 長的重組蛋白質。利用 Anti-His-tag mAb (正對照組)、Anti-E mAb、Anti-CHIKV mAb 等，決定重組蛋白質是否帶特異的抗原決定位置(Western blot, Immunoprecipitation)。再大量表現、純化，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性。

9. 融合瘤之製備：

(1) 茲卡及登革熱病毒、屈公病毒之純化：ZIKV、DENV 及 CHIKV 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 ZIKV、DENV 及 CHIKV 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℃，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 ZIKV E domain III 與 NS1 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 ZIKV 或 CHIKV 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 ZIKV 或 CHIKV 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 $3\times10^7$。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 骨髓癌細胞混合，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℃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 µl）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 µl 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 µl 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。

10. 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℃隔夜後，以 1% BSA 進行 Block，37ºC 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 37ºC 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 37ºC 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。

11. 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 Labortories)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

(lysin/a-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。

12. 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℃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℃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℃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℃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℃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-鹼性磷酸脢結合体，於 37℃反應 1 小時。最後加入酵素受質體 PNPP，於室溫作用 30-60 分鐘分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

13. 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。

14. 節肢病媒的收集方法：本次收集用來進行 *Wolbachia* 檢驗之節肢病媒檢體主要包括對時下臺灣病媒傳染病扮演重要角色之病媒，如傳播登革

熱、屈公病毒及茲卡病毒之埃及斑蚊、白線斑蚊；傳播日本腦炎之三斑家蚊、環蚊家蚊、白頭家蚊，另臺灣潛在之重要病媒，如傳播瘧疾之微小瘧蚊、中華瘧蚊，傳播絲蟲病之熱帶家蚊、白蛉、庫蠓及蚋[30, 31]。檢體來源包括各縣市掛燈送檢之節肢病媒檢體、瘧蚊調查計畫由地方衛生局掛燈送檢之樣本及由本實驗室自行採集之病媒，進行帶 *Wolbachia* 之分析。其中熱帶家蚊、三斑家蚊、環蚊家蚊、中華瘧蚊及白線斑蚊廣泛分布於各地，埃及斑蚊及微小瘧蚊則具地理分布範圍，白頭家蚊過去統計資料則採獲量較少。因臺灣過去有報導 6 例由白蛉傳播的利什曼原蟲病，本研究亦將白蛉列為優先評估病媒，進行後續的檢驗與分析。

15. 節肢病媒的鑑定方法：家蚊、瘧蚊及斑蚊等蚊蟲之鑑定方法將依照臺灣蚊種檢索表形態進行確認[32]，庫蠓、白蛉及蚋除依形態學鑑定外[33-37]，因蟲體微小輔以實驗室建立之分子生物學方法作為物種鑑定的依據[38-40]，使用之引子如下表 A。

16. 表 A、庫蠓、白蛉及蚋分子生物學方法鑑定引子:

| 病媒 | 引子名稱 | 引子序列 |
|---|---|---|
| 庫蠓 | COI J-1718 | 5´-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT-3´ |
| | COI N-2191 | 5´-AGGTAAAATTAAAATATAAACTTCTGG-3´ |
| 白蛉 | 18S rRNA F | 5´-TAGTGAAACCGCAAAAGGCTCAG-3´ |
| | 18S rRNA R | 5´- CTCGGATGTGAGTCCTGTATTGT -3´ |
| 蚋 | COI LCO1490 | 5´-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3´ |
| | COI HCO2198 | 5´-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3´ |

17. 蟲媒帶 *Wolbachia* 之分子生物學檢測方法：實驗室針對單一蟲媒萃取 DNA，並設計之巢式 PCR （Nested-PCR）專一性引子增幅 *Wolbachia* 的表面蛋白基因（*Wolbachia* surface protein, Wsp）以及 16S rRNA，設計引子如下表 B。wsp-37F、wsp-681R 及 16S rRNA LF、16S rRNA SpecR 為第一次增幅的引子，wsp-81F、 wsp-678R 及 16S rRNA w553F、16S rRNA w1334R 為第二次增幅的引子。增幅的結果跑電泳

確認，再將專一訊號的產物進行基因定序，定序結果與 NCBI 資料庫進行比對，確認結果之確性，以了解國內各類型的節肢病媒感染 *Wolbachia* 的種類及比率。

18. 表 B、*Wolbachia* 表面蛋白基因 wsp 及核糖體 16S rRNA 巢式 PCR 專一性引子。

| 引子名稱 | 引子序列 | 備註 |
|---|---|---|
| Wsp-37F | 5´-ACGTTGCTAAGTTTATCAAACTCTGC-3´ | |
| Wsp-681R | 5´-ACTCCAGCTTCTGCACCAA-3´ | |
| Wsp-691R | 5´-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3´ | |
| Wsp-81F | 5´-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3´ | Nested-PCR |
| Wsp-678R | 5´-CAGCTTCTGCACCAAMAG-3´ | |
| 16S rRNA LF | 5´-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3´ | |
| 16S rRNA SpecR | 5´-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3´ | |
| 16S rRNA w553F | 5´-ATACGGAGAGGGCTAGCGTTA-3´ | Nested-PCR |
| 16S rRNA w1334R | 5´-CTTCATRYACTCGAGTTGCWGAGT-3´ | |

19. 建立基因演化樹：實驗室將 wsp 及 16S rRNA 分子生物學檢測為陽性之 Nested-PCR 樣本，經基因定序確認無誤後，再將定序結果輸入至 MEGA X 軟體以建構演化樹。定序結果將與 NCBI 資料庫有記錄之 *Wolbachia* 菌種進行比對，並依受 *Wolbachia* 感染的蚊種分別作出演化樹。本次計畫中共使用 3 個 supergroup A、2 個 supergroup、1 個 supergroup C、1 個 supergroup D、2 個 supergroup 的 *Wolbachia* 菌種進行分群，其中 supergroup C、D 作為外群 （out-group）。使用最大概似估計法（maximum likelihood）建構演化樹，演化樹模型先經過蛋白質最佳化檢驗後選用 T92（Tamura 3-parameter），取樣次數為 1,000 次（bootstrap value=1000），另外考量到細菌的序列相似度較高，建構好的演化樹設定閾值為 50 （Cut-off value＝50） ，以了解國內各類型的節肢病媒感染 *Wolbachia* 的演化地位[23, 41]。

20. 分離蚊蟲體內的 *Wolbachia* 至實驗室細胞株：實驗室目前嘗試使用白線斑蚊幼蟲細胞株（C6/36）進行 *Wolbachia* 的分離與培養，分子檢測

*Wolbachia* 陽性之蟲媒檢體，參考 STENOS 等人、Dobson 等人及 Noda 等人的做法將 *Wolbachia* 分離[42-44]。C6/36 細胞株使用含有 10% 胎牛血清 （Fetal Bovine Serum, FBS）的 DMEM 溶液培養於 shell vial 或 6 孔細胞培養盤，至細胞生長到 80%匯合度後始進行 *Wolbachia* 感染實驗。

21. 使用蚊卵或白線斑蚊卵巢，將卵巢組織以 70% 酒精浸潤 2 次以清除組織表面的細菌，再使用無菌水浸潤 2 次，最後使組織浸泡於 1 ml 的 PBS 中。使用均質機將組織均質化後，取上清液 500 ml 接種於 shell vial 或 6 孔細胞培養盤，於 15˚C、2500g 離心 1 小時。離心結束後，更換培養液並換至新的培養盤中進行培養，後續約一個星期分養兩次。於分養 2-4 次後，萃取其 DNA 開始檢測細胞實際感染 *Wolbachia* 的情形[45]。

## 三、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：2020 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 2,243 件，以 real-time RT-PCR 及 ELISA 篩檢屈公病毒(CHIKV)，共偵測出 3 例屈公病境外移入病例，分別來自馬來西亞、泰國及印尼**(Fig.1)**。分離出馬來西亞及泰國病毒株皆屬於 East/Central/South African genotype **(Fig. 2 )**。
2. 茲卡病毒感染症之監測：2020 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 2,243 件，以 real-time RT-PCR 及 ELISA 篩檢茲卡病毒(ZIKV)，共偵測出 2 例境外移入茲卡病毒感染症病例，來自泰國及馬來西亞 **(Fig. 1)**。
3. 日本腦炎之監測：2020 年 1/1~10/31 來自醫師通報的檢體有 317 件，共測出 21 例日本腦炎病例，6-7 月為流行高峰 **(Fig. 3)**，病例分布以桃園市(4 例)、新北市、南投縣及屏東縣各 3 例為多**(Fig. 4)**。感染年齡以 50-59 歲最多，占 52% **(Fig. 5)**。7-8 月間於關渡自然公園採集 3,471 隻病媒蚊，分為 78 池，其中 1 池日本腦炎病毒(JEV) PCR 陽性，屬於 genotype I，1 池 Tembusu virus PCR 陽性**(Table 1)**。
4. 漢他病毒感染症之監測：2020 年 1/1~10/31，來自醫師通報的檢體有 130 件，共測出 11 例漢他病毒感染症病例 **(Fig. 6)**，為歷年最多。其中高雄市 5 例及屏東縣 3 例最多**(Fig. 7)**。PCR 陽性有 5 例，定序結果皆屬於首爾病毒(Seoul virus; SEOV) **(Fig. 8)**。

## (二) 、arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

### 1. 建置病媒病毒外套膜及非結構基因-1 重組蛋白質體

利用 gene cloning 方法在 baculovirus 或 E.coli 表現系統上，建置含有茲卡病毒、登革熱及屈公病毒外套膜(E)基因重組蛋白質及茲卡病毒的非結構性 1(NS1)基因重組蛋白的質體基因庫。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，如表一。

### 2. 開發偵測屈公病抗原與 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑

利用 gene cloning 方法分別在 baculovirus 及 E coli 系統上生產 341 a.a. 長，約為 40 kd 的屈公病毒 E2 基因重組蛋白質，經純化後可用於 ELISA 或 ICT 等為基礎的快速檢驗試劑檢驗，如(1)、(2)。目前以產製的 E2 重組蛋白應用於發展 Indirect IgM/IgG ELISA 及 ICT，並將檢測結果與市售 InBios capture IgM ELISA 及 CTK onsite rapid test 的檢驗結果做比較。

利用產製的單株抗體 1B1 與 goat anti-Human IgM/IgG 抗體塗佈於 Nitrocellulose membrane 之測試線（Test line）與控制線（Control line）位置，並將 CHIK E2 重組蛋白與膠體金(colloidal gold)作結合後塗佈於結合墊，組裝成屈公病 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑，能成功偵測屈公病陽性檢體，如 Fig3。

純化屈公抗原免疫鼠支，篩選出 ELISA、IFA 與 western plot 反應佳的單株抗體，如 Fig4。將篩選出的抗體進行親和性分析，如 Fig5。 挑選高親和性的抗體進行配對組合，如 Fig6。經由抗體配對分析後，挑選 anti-E1、E2 (5C5.2, 4F4.3)當 capture；1B1.1.2 當 detector 的抗體組合，進行臨床檢體的血清學測試，結果如 Fig7。

定量屈公病毒抗原血清學偵測極限約落在 5^$10^3$ ；ICT 的偵測極限約落

在 5^104 仍能看見訊號，如 Fig8。對照 ELISA 檢測結果(Fig7)，發病後第一、二天血清檢體中的屈公抗原濃度因個體差異頗大，但大約至少在 3^$10^4$ pfu/ml 以上，故屈公病人發病二日內的檢體約有 90%可由抗原 ELISA 檢測到；ICT 則月 76.5%可以測得，如 Fig8。第五天以後 IgM 抗體出現，也可由偵測 IgM 抗體 ELISA 或 ICT 檢測到。

Fig10 為屈公病抗原與抗體 combo ELISA ，在 5 天內的早期診斷中，因 5 天內的檢體中檢出率為 66.7% ; 5 日後的 IgM 抗體檢測則為 97.4%。由於屈公病人在發病後，抗原在血液中效價會快速降低且時間較短，故目前市面上並無偵測屈公抗原的快篩試劑。Fig11 為市售 CTK onsite IgM combo rapid test 測試結果，對照自行研發的試劑，針對抗體的部分，其靈敏度與專一性分別為 67%, 100%與 73%, 96%。如果為抗原&抗體 combo rapid test 檢測靈敏度則上升為 85.5%，專一性為 92%，開發的屈公病抗原及抗體 combo ICT 檢驗試劑，因為結合偵測抗原，能檢測出急性期個案，有效防止屈公病原快速傳播出去。

**3. 開發偵測登革熱抗原與 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑**

(1) 以結合四型的登革熱 E DIII 重組蛋白應用於發展 Indirect IgM/IgG ELISA 及 ICT，進行登革熱 IgM/IgG 抗體的血清學檢測，可明確辨認登革熱四型病人血清中的 IgM/IgG 抗體，並與市售試劑作比較。F12 及 Fig13 為表現登革熱 tetra-E DIII 重組蛋白來進行登革熱 IgM/IgG 抗體的血清學檢測，與 routine virus dependent IgM/IgG ELISA 的方法做比較，結果顯示均可明確辨認登革熱四型病人血清中的 IgM/IgG 抗體，並與市售 SD 的登革熱 IgM/IgG ICT 試劑進行評估比較，除了 D1-59370 個案的 SD ICT 測試結果較為微弱，其餘測試結果相同，如 Fig14。

(2) 其中 D3-62966 個案在回溯 ELISA 檢驗結果時發現此為( D3/ chikungunya) coinfection 個案，個案既為登革熱 RT-PCR 陽性；也是屈公病 IgM/IgG 抗體陽性個案的檢體，所以登革熱抗體檢測試劑偵測不到。但如果用結合登革熱&屈公病的 combo ICT，就能很快偵測到個案是屈公病 IgM/IgG 抗體，如果是用 arbovirus 抗體搭配登革熱 NS1 抗原檢測，更能掌控這些個案的發病狀況，能即時檢測，防止疫情擴散結合登革熱 NS1 抗原及抗體的快速檢驗試劑，確實可提升急性期血清檢驗的靈敏度，可即時啟動防治措施，阻止病毒的快速擴散，將有助於病媒性傳染病的防治工作。

(3) 每年的 7~9 月是登革熱境外移入高峰，當有陽性個案無法在機場港口及時偵測攔檢到，就會進入社區本土流行，由於可能會有不同型別登革熱傳播，結合分型 NS1 & IgM/IgG 抗體的快速檢驗試劑，除了提升檢測靈敏度，更能即時分析感染個案追蹤感染源，如 Fig15。

## （三）、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

### 1. 蟲媒採集及鑑定結果

本計畫透過實驗室過去收集之蟲媒檢體、矮小瘧蚊計畫中各縣市衛生局持續送檢之蟲媒檢體、以及港埠監測計畫收集之蟲媒檢體，預計於全臺灣共 21 縣市收集文獻上有帶病原可能，且在臺灣具備較高風險之蟲媒。截至目前為止，熱帶家蚊共 4 縣市 20 隻、三斑家蚊 1 縣市 5 隻、白頭家蚊 2 縣市 18 隻、中華瘧蚊共 6 縣市 40 隻、矮小瘧蚊 2 縣市 13 隻、埃及斑蚊共 3 縣市 155 隻，白蛉 122 隻，總計 373 隻。目前收集到的蟲媒檢體種類有侷限於南部及東部縣市的趨勢，以臺南市 7 種、屏東縣 5 種及高雄市 4 種較多，宜蘭縣 2 種及花蓮縣 2 種次之，嘉義縣、台東縣、新北市、桃園縣皆有收集到中華瘧蚊 1 種（**表一**）。

### 2. 檢測蟲媒體內感染 *Wolbachia* 的情形

為了瞭解 *Wolbachia* 於臺灣各縣市的流行情形，本計畫將針對 8 種蟲媒進行帶 *Wolbachia* 檢測。實驗室以 *Wolbachia* 的表面蛋白設計之專一性引子進行 Nested-PCR，實驗室設計的 PCR 引子於第一輪增幅使用 wsp-37F 與 wsp-681R 偵測極限約為 100 copies / reaction，於第二輪增幅使用 Nested-PCR 引子 wsp-81F 與 wsp-678R 偵測極限約可提升至 1 copy / reaction（**圖一**），敏感度提昇 100 倍，且可偵測微量標的產物。

熱帶家蚊目前已完成檢測 4 個縣市共 20 隻，其中有 13 隻於第一輪增幅檢測出 *Wolbachia*，於第二輪增幅提升至 19 隻，總陽性率為 95 %。中華瘧蚊完成檢測 8 個縣市共 40 隻，其中有 3 隻於第一輪增幅檢測出 *Wolbachia*，於第二輪增幅提升至 13 隻，總陽性率為 32.5 %。三斑家蚊過去於文獻中報導並無檢測出攜帶有 *Wolbachia*，完成檢測 1 個縣市共 5 隻，並無檢測出 *Wolbachia*。白頭家蚊完成檢測 3 個縣市共 18 隻，其中有 1 隻於第一輪增幅檢測出 *Wolbachia*，於第二輪增幅提升至 4 隻，總陽性率為 22.2 %。

埃及斑蚊完成檢測 2016 及 2020 之台南市、高雄市、屏東市共 155 隻，其中第一輪增幅 *Wolbachia* 之檢測均為陰性，於第二輪增幅提升至 34 隻，總陽性率為 21.9％。矮小瘧蚊過去於文獻中亦多稱無感染 *Wolbachia* 的案例，實驗室完成檢測 2 個縣市共 13 隻，並無檢測出 *Wolbachia* （**表一、表二**）。 白蛉共檢測四種，包含應氏司蛉 71 隻（*Sergentomyia* iyengari）、鮑氏司蛉 33 隻（*S.* barraudi）、鱗胸司蛉 11 隻（*S.* squamipleuris）及一種基因型不同於上述三者之未知種類白蛉 7 隻（*Phlebotominae* sp.）。使用 Nested-PCR 進行增幅，四種司蛉 *Wolbachia* 感染率分別提升至 29.6 %、48.5％、63.6％及 28.6％，總計野外白蛉的 *Wolbachia* 感染率估計為 37.7%（**表三**）。

**3. *Wolbachia* 序列分析結果**

*Wolbachia* 表面蛋白基因（wsp）經過 Nested-PCR 後，將 Nested-PCR 結果呈現陽性訊號的樣本進行基因定序，所得之基因序列與 NCBI 資料庫有記錄之 *Wolbachia* 菌種進行比對，並依 *Wolbachia* 感染的蚊種分別作出演化樹。參考序列中，wMel（supergroup A）首次被發現的感染對象為黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)，其中白線斑蚊也被發現會感染 wMel[16, 46]。wRi 及 wBai （supergroup A）主要感染擬果蠅（*Drosophila* simulans）[47, 48]，wPipPel （supergroup B）主要感染對象為家蚊[49-51]，而 wAlbB（supergroup B）則是於班蚊、家蚊及瘧蚊都有於文獻中被偵測到[52, 53]。另外，supergroup C、D 主要感染對象為線蟲、且遺傳差異性較大[54]，因此本次構建演化樹時選用作為外群 （out-group）。

19 隻測得 *Wolbachia* 的熱帶家蚊中，有 16 隻與同樣從家蚊中分離出來的 *Wolbachia* 菌株 wPipPel 分入同一群中，其餘 3 隻與資料庫種雖有差異，但仍可辨別其中 2 隻（KHH-01、KHH-03）為 supergroup B、另 1 隻（KHH-2）為 supergroup A （圖二）。13 隻測得 *Wolbachia* 的中華瘧蚊中，有 8 隻

與 wPipPel 為同一群，1 隻與 wAlbB 為同一群，1 隻與 wMel 為同一群，其餘 3 隻中有 1 隻（TNN-03）為 supergroup A，另外 2 隻（NTPC-01、ILA-01）可能需要更多比對資料才能確定分至哪一個 supergroup（**圖三**）。4 隻測得 *Wolbachia* 的白頭家蚊中，有 3 隻與 wPipPel 分至同一群，另 1 隻也被分入 supergroup B （**圖四**）。

2016 年 80 隻埃及斑蚊中 16 隻測得 *Wolbachia*，有 13 隻與 wAlbB 為同一群，2 隻與 wPipPel 為同一群，1 隻與 wMel 為同一群 （圖五 A）；2020 年 75 隻埃及斑蚊有 18 隻測得 *Wolbachia*，10 隻與 supergroup A 為同一群，7 隻與 wAlbB 為同一群，另有 1 隻（KHH- 02）序列差異較大，無法有效分群，經與 NCBI 資料庫進行比對後確認為 supergroup B（KY658655.1） （**圖五 B**），臺灣埃及蚊族群帶有 supergroup A 及 supergroup B 之 *Wolbachia*。

另白蛉 wsp 基因其演化樹結果，應氏司蛉與鮑氏司蛉的 *Wolbachia* 歸為同一群無法分開，並與 *Ph. Sergenti*、*Ph.. Papatasi* 的 *Wolbachia* 及白線斑蚊的 *wAlbA* 等 supergroup A 較近，而鱗胸司蛉的 *Wolbachia* 則獨立為一群，與應氏司蛉與鮑氏司蛉的 *Wolbachia* 差異較大，並不同於其他 supergroup，從白線斑蚊分離作為陽性對照組的 *Wolbachia* 與 NCBI 資料庫之 wAlbB 屬同一群 （**圖六**）。

**4. 建立 *Wolbachia* 體外培養技術平台**

現已完成細胞培養室之設備、材料建置，細胞培養及 *Wolbachia* 分離方法建立，並已進行自蚊蟲或其卵分離 *Wolbachia*。

## 四、討論

### （一）、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

1. 2020 年 1/1~10/31，來自醫師通報及機場發燒篩檢等檢體共 2,243 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病例，共發現 3 例境外移入屈公病，分別來自馬來西亞、泰國及印尼，及 2 例境外移入茲卡病毒感染病例，來自泰國及馬來西亞。2020 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)的確定病例數降低。
2. 2020 年 1/1~10/31，共偵測出 21 例日本腦炎病例。病例分布以桃園市(4 例)、新北市、南投縣及屏東縣各 3 例為多。病例年齡分布仍以 50-59 歲為主要感染族群。病媒蚊採集方面，7-8 月間於關渡自然公園採集 3,471 隻病媒蚊，分為 78 池，其中 1 池為日本腦炎病毒(JEV) PCR 陽性，屬於 genotype I，1 池為 Tembusu virus PCR 陽性。
3. 漢他病毒感染症為一種急性人畜共通病毒性傳染病，也是台灣的地方性傳染病。2020 年 1/1-10/31 共偵測出 11 例漢他病毒感染症病例，為歷年最多，其中高雄市 5 例及屏東縣 3 例最多。過去的研究及監測報告，僅發現台灣有首爾病毒(Seoul virus; SEOV)流行於嚙齒類動物，未曾發現其他漢他病毒株。2020 年共檢測出 5 例漢他病毒 PCR 陽性，定序結果也皆屬於 SEOV。為減少受漢他病毒感染，在居家及周圍應實鼠類防治。

## (二)、arbovirus 整合型檢測試劑效能之評估

1. 茲卡、屈公病與登革熱等病媒病毒傳染病並非台灣本土性的流行疾病,其中登革熱與屈公病的流行主要是由境外移入的病毒入侵,而造成本土的疫情。由於近年來全球升溫導致病媒病毒傳染病有持續增加的趨勢，因此發展快速又靈敏的 arbovirus 診斷與監測系統，以期早期診斷及防治，是實驗室努力的目標之一。
2. 目前疾管署茲卡及屈公病檢驗包括三個項目：病毒分離、病毒核酸分子檢測、及 IgM/IgG 抗體檢測。登革熱 NS1 抗原檢測於 2008 年六月開始在機場發燒篩檢實施，所使用的試劑是 ICT 型式的快速檢驗試劑。
3. 由於機場的發燒篩檢站可以檢測出處於急性期的、發燒的登革熱境外移入病例，所以在機場使用 NS1 Ag ICT test 可以減少臨床與實驗室診斷的時間差距,一旦病例確定後,可即時啟動防治措施,有效的防止境外移入的傳染病造成本土的傳播及流行。故開發出可同時檢測，並進而可進行識別的屈公病、茲卡與登革熱整合型 arbovirus 快速檢驗試劑，對邊境檢測境外移入的疑似病例，更能有效的防止 arbovirus 的入侵及流行。
4. 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。本計畫重點為接續發展茲卡、登革熱及屈公病外套膜(E)重組蛋白，結合抗原與單株抗體組合開發出抗體快速檢驗試劑，將屈公病、登革熱與茲卡的抗體與抗原來組成整合型 arbovirus 快速檢驗試劑，以提早判定 PCR(-)，IgM/IgG (+)的可能病例（probable case，其中包含二次感染個案）。快速檢測試劑，除了使用方便，能快速獲得檢驗結果。

5. arbovirus 的抗體/抗原快速檢測試劑，可根據 Ag test 與 IgM/IgG 的陽性結果，快速識別感染何種病原體。這除了使用方便，能快速獲得檢驗結果外，確實可提升急性期血清檢驗的靈敏度，可即時啟動防治措施，阻止病毒的快速擴散，將有助於病媒性傳染病的防治工作。
6. 最終期望完成(1)開發屈公病、登革熱與茲卡抗原快速檢驗試劑，應用於急性期之感染。(2) 開發屈公病、登革熱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。(3)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機場發燒篩檢及醫療院所，對茲卡、登革熱及屈公熱等病媒性傳染病疑似病例進行快速檢驗，這診斷與監測系統將有助於病媒性傳染病的防治工作。

## （三）、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

1. 高敏感度的分子生物學檢測方法檢驗 *Wolbachia*：目前國際文獻上使用偵測 *Wolbachia* 的 PCR 引子 wsp-81F 與 wsp-691R 偵測極限約為 100 copies / reaction，然為提高敏感度以確定 *Wolbachia* 在病媒中之感染情形，實驗室開發 Nested-PCR 檢驗方法以進行更敏感的檢測。臺灣過去亦有對埃及斑蚊 *Wolbachia* 使用傳統 PCR 進行檢測，並無偵測到陽性訊號[23]，相對本研究利用高敏感性的 Nested PCR 進行檢測，發現野外埃及斑蚊感染 *Wolbachia* 的比例為 21.9 %。其他國家亦有對埃及斑蚊進行 *Wolbachia* 檢測，相較於臺灣測得 22 %（2016：20%；2020：24%）陽性率，美國佛羅里達州陽性率為 4.3 %[55]、菲律賓為 10 % [56]，而美國新墨西哥州有測得最高的陽性率為 57.4 %[55]，在馬來西亞及印度亦有報導埃及斑蚊帶有 *Wolbachia* 之情形[57]。
2. 綜合本研究與其它文獻之結果均顯示埃及斑蚊確實有自然感染 supergroup A 及 supergroup B 的 *Wolbachia*，若未來欲採取 *Wolbachia* 作為病媒防治的策略，無論是採取族群取代策略（replacement strategy）或族群抑制策略（reduction strategy）的方法，皆需進一步評估野外埃及斑蚊自然感染的 *Wolbachia* 可能造成的影響。
3. 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，本研究指出埃及斑蚊 *Wolbachia* 檢測在 Nested-PCR 之第一次增幅為陰性，第二次增幅方為陽性，代表其所帶有的密度（density）相對低，然而該野外自然感染 *Wolbachia* 的埃及斑蚊其抑制病毒傳播的影響仍然未知。再者，文獻顯示較高的環境溫度（<29°C）亦會導致

*Wolbachia* 菌株於蚊蟲體內的密度下降，間接影響病毒抑制效果與蚊蟲細胞間質不相容（Cytoplasmic incompatibility，CI）[58, 59]，臺灣埃及斑蚊主要位於南部三縣市之熱帶地區，如欲採行 *Wolbachia* 防治策略，*Wolbachia* 密度對不同病毒的影響，包括對本土節肢病毒（登革病毒及日本腦炎病毒）及外來病毒（茲卡病毒及屈公病毒），將進一步評估。

4. 臺灣病媒測得 *Wolbachia* 陽性率與國際現有文獻的比較熱帶家蚊於大多數文獻中普遍有檢測出 *Wolbachia*，檢驗到的 *Wolbachia* 陽性率從 58.5 %至 95.8 %[60, 61]，與本次計畫所得陽性率 95 %的結果大致相符。三斑家蚊、環蚊家蚊和白頭家蚊為日本腦炎的主要傳播源，三斑家蚊過去文獻上多提及不會感染 *Wolbachia*，本次測得陽性率亦為 0 % （0/5），與國際及臺灣過去研究相同[23]，而目前文獻上偵對白頭家蚊感染 *Wolbachia* 的情形資料很少，本研究統計白頭家蚊 *Wolbachia* 陽性率為 22.2 % （4/18）。
5. 目前已有人工轉染 *Wolbachia* 瘧蚊體內並發現其能有效抑制瘧原蟲，然國際上瘧蚊屬的蟲媒自然感染 *Wolbachia* 的情形尚待釐清，過去在臺灣中華瘧蚊的檢測為陰性[23]，而本次計畫中華瘧蚊測得 *Wolbachia* 陽性率為 32.5 %（13/40），而矮小瘧蚊為臺灣瘧疾的主要病媒，本研究首次進行 *Wolbachia* 檢測，檢驗陽性率為 0 % （0/13）。上述檢驗陽性率的提昇應與本次提高敏感度之檢驗方法有關，然部分蟲媒如三斑家蚊因蟲媒檢體數量較少，可能仍須再收集更多檢體。
6. 本研究亦檢測利什曼原蟲之病媒白蛉共四種，應氏司蛉、鮑氏司蛉、鱗胸司蛉及一種基因型不同於上述三者之未知種類白蛉，

使用 Nested-PCR 檢測 *Wolbachia* 感染率分別到 29.6%、48.5%、63.6 %及 28.6%，其中基因數分析發現鱗胸司蛉為一群與過去報導之 *Wolbachia* 屬不同群，可進一步探討，而本研究所設計之方法亦可用於白蛉帶 *Wolbachia* 之檢測，且目前文獻對臺灣白蛉報導多為形態學分類，本研究結果可就白蛉新型病媒防治技術提供評估資訊及工具。本研究之 Nested-PCR 陽性訊號檢體一律經過定序確認，且定序結果與當次所用之陽性對照組不同，排除偽陽性的情形，且部分檢驗結果為 *Wolbachia* supergroup A，與陽性對照組 supergroup B 不同。

7. 演化樹的分群：*Wolbachia* 已知於多數節肢動物都有感染，而且隨著檢驗方法的進步，原 *Wolbachia* 的分群也更明確，截止至 2020 年已經分出 18 個 supergroup[62]。本次繪製演化樹使用 7 種較常見於蚊蟲上、且紀錄於 NCBI 資料庫的 *Wolbachia* 菌種進行比對，然而文獻上更嚴謹的 *Wolbachia* 分類方法主要是同時分析包含 wsp 在內的 5 種其他基因進行交叉比對（ftsZ、dnaA、gatB、fbpA 及 coxA），未來若需確定其演化地位，需進行更多基因片斷的分析。

## 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，減少病毒的境外移入，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℃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性傳染病，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、家鼷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 年的病例數有暴增的現象，仍應預防鼠害。

良好的檢驗試劑，需經由不斷的改良與試驗，以增加檢驗的專一性及靈敏度，並同時能檢測出不同血清型別、不同地理區域之病毒株，使之更可靠的應用於病媒病毒的例行性檢驗。在病毒株不斷的演化，新的病毒株不斷的出現下，需持續提升診斷試劑的靈敏度。由於研發過程長，需時間與有經驗的人才，及有長期的研發策略，以因應未來的發展。

相較於國際文獻上使用的 PCR 傳統檢測方法為 100 copy / reaction，本研究所設計之 Nested-PCR 方法可提升檢測敏感度至 1 copy / reaction，較傳統 PCR 檢驗方法偵測極限提昇 100 倍，未來可作為評估病媒感染 *Wolbachia* 之調查工具。

臺灣野外埃及斑蚊自然的感染 *Wolbachia* 的比例為 22%，且包含 supergroup A 及 supergroup B，在採取 *Wolbachia* 病媒防治方法時，應該將野外自然感染的族群也納入評估。另 2016 年之 *Wolbachia* 主要為 supergroup B（94%）而 2020 年則以 supergroup A（56 %）為主，趨勢的改變則需要更多的調查及研究。

## 六、重要研究成果及具體建議

**1.** 計畫之新發現或新發明: 2020 年 1/1-10/31 共偵測出 3 例境外移入屈公病及 2 例茲卡病毒感染症病例。偵測出 21 例日本腦炎病例，接種疫苗仍為預防日本腦炎最重要的方法。偵測出 11 例漢他病毒感染症病例，為歷年最多，應加強防治鼠害。本計畫建置氣候變遷相關病媒性傳染病(ZIKV, CHIKV, JEV, SEOV)之病原體基因體資料庫，有助於了解病毒在台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，提供緊急防治的參考及對策。

**2.** 由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加。茲卡病毒、登革病毒及屈公病毒等 arbovirus 所引起的疾病，是台灣地區重要的境外移入病媒性傳染病，近年來病例都有持續增加的趨勢。本計畫在應用免疫色層分析法技術（ICT）與酵素免疫分析法(ELISA)，開發病媒病毒快速檢驗試劑，以發揮及時檢測(On-site)的優點，可應用於機場發燒篩檢及醫療院所(Point of Care Testing)。將有助於防止境外移入與本土擴散，並幫助病人的及時診斷與治療。

**3.** 計畫對民眾具教育宣導之成果：加強衛教宣導、實施病人自主管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無 發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的監測與通報系統配合。

**4.** 計畫對醫藥衛生政策之具體建議：病媒病毒媒介的傳染病在全球升溫的環境下，須加強監控與鑑別診斷，未來應加強機場發燒篩檢監測，並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學研究。未來可考慮製作 ICT 為基礎的快速檢驗試劑，在

機場、港阜當地進行定期檢測監控，及在醫療院所使用快速檢驗試劑，及早檢驗出確定病例。

**5.** 計畫對民眾具教育宣導之成果：相關單位在舉辦研討會及教育訓練時，應將登革熱、茲卡病毒感染症、屈公病、日本腦炎與漢他病毒感染症之臨床特徵及檢驗方法納入宣導及教育內容。境外移入病媒病毒傳染病之病例數逐年上升，許多無症狀、無發燒之空窗期患者，需要其他監測系統配合，應加強衛教宣導、鼓勵病人自我通報及加強醫師通報等。日本腦炎方面，應強調現有的日本腦炎疫苗能提供具有保護力的中和抗體，鼓勵幼兒按計畫施打疫苗。對高年齡的民眾，若有需要，可考慮再施打疫苗，降低感染的風險。漢他病毒感染症的預防以鼠害防治為主。

**6.** 計畫對醫藥衛生政策之具體建議：因應交通便捷及氣候變遷，台灣地區未來很可能發生病媒病毒傳染病的共同流行(如登革熱、茲卡病毒感染症及屈公病等)。應加強監測，配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒病毒傳染病的監測、檢驗與流行病學研究。

**7.** 本研究設計高敏感性 *Wolbachia* 分子生物學檢測方法，偵測極限為傳統 PCR 的 100 倍，並首度於埃及斑蚊體內測到低密度的 *Wolbachia* 感染，其 陽性率為 22 %。

# 七、參考文獻

## (一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析


1. Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu. Rev. Microbiol. 44: 649-688.Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. Epidemiol Rev. 14:197-221.
2. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. Arch Virol. 2007;152:687-96.
3. 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;360:2536-43
4. Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A. A., and Musso, D. (2014). Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerging infectious diseases, 20(6):1085-1086.
5. 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;94:675–686.
6. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. Curr Opin Virol. 2017 25;27:1-7.
7. 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; 115: 223-225.
8. Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. Epidemiol Rev. 14:197-221.
9. Hu SMK, Grayston JT. 1962. Encephalitis on Taiwan II. Mosquito Collection and Bionomic Studies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 11：131-140.
10. Wu YC, Huang YS, Chien LJ, Lin TL, Yueh YY, Tseng WL, Chang KJ, and Wang GR. 1999. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. Am J Trop Med Hyg 61, 78-84.
11. Su CL, Yang CF, Teng HJ, Lu LC, Lin C, Tsai KH, Chen YY, Chen LY, Chang SF, Shu PY. 2004. Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes in Taiwan during 2005-2012. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct 2;8(10):e3122.
12. Williams DT, Wang LF, Daniels PW, Mackenzie J S. 2000. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. J Gen Virol 81, 2471–2480.
13. Uchil PD, Satchidanandam V. 2001. 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. 65:242 - 51.
14. Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardosa MJ, Barrett AD. 2003. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. J Virol. 77:3091–8.
15. Nga PT, del Carmen Parquet M, Cuong VD, Ma SP, Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS, Morita K. 2004. 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. 85:1625-31.
16. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and

resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat Med. 10 (12 Suppl):S98-109.
17. Nitatpattana N, Dubot-Pérès A, Gouilh MA, Souris M, Barbazan P, Yoksan S, de Lamballerie X, Gonzalez JP. 2008. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. Emerg Infect Dis. 14:1762-5.
18. Wang HY, Takasaki T, Fu SH, Sun XH, Zhang HL, Wang ZX, Hao ZY, Zhang JK, Tang Q, Kotaki A, Tajima S, Liang XF, Yang WZ, Kurane I, Liang GD. 2007. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. J Gen Virol. 88:885-94.
19. Nabeshima T, Loan HT, Inoue S, Sumiyoshi M, Haruta Y, Nga PT, Huoung VT, del Carmen Parquet M, Hasebe F, Morita K. 2009. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. J Gen Virol. 90:827-32.
20. 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;16:876-8.
21. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet. 2012;379:662-71.
22. Perkins TA, Metcalf CJE, Grenfell BT, Tatem AJ. Estimating Drivers of Autochthonous Transmission of Chikungunya Virus in its Invasion of the Americas. PLOS Currents Outbreaks. 2015.
23. Yang CF, Su CL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Huang JC, Shu PY. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2014. Emerg Infect Dis. 2016, 22:1981-1984.
24. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, Lin CC, Shu PY. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. Emerg Infect Dis. 2009;15:1854-6.
25. 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。
26. 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。
27. 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。
28. 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。
29. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. 2003. Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I Real-Time Reverse Transcription-PCR for Dengue Virus. J ClinMicrobiol. 41:2408-16.

## (二) 、開發檢測 arbovirus 的整合型快速檢測試劑


1. Powers AM, Logue CH, 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. J Gen Virol 88: 2363-77.
2. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M, 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis 7:319-27.
3. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C, 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. Virology 25;393:183-97
4. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al., 2005. Fever screening at airports and imported dengue. Emerg Infect Dis 11:460-2.
5. Zika virus WHO，http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/
6. Fagbami AH.Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State.J Hyg (Lond). 1979 Oct;83(2):213-9
7. 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:
8. Huang JH, LinTH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Liang-Chen Lu, Cheo Lin, Yang CF, Chang SF, Liao TL, Yu SK, Cheng CH, Chang MC, Hu HC, and Shu PY Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus, Taiwan . Emerg Infect Dis. 2010 May; 16(5): 876–878.
9. Haiyan Zhao, Estefania Fernandez, Kimberly A. Dowd, Scott D. Speer, Derek J. Platt, Matthew J. Gorman, Jennifer Govero, Christopher A. Nelson,Theodore C. Pierson, Michael S. Diamond,* and Daved H. Fremont. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. , Cell (2016), http://dx.doi.org/ 10.1016/j.cell.2016.07.020ute, Department of Virology, POB21, FIN-O0014 University of Helsinki, Fi

## (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. site, C.w., *www.cdc.gov.tw.*
4. CDC, T., *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 scapulalis 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. Woodford, L., et al., *Vector species-specific association between natural Wolbachia infections and avian malaria in black fly populations.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4188.
31. Rao, R.U., et al., *A real-time PCR-based assay for detection of Wuchereria bancrofti DNA in blood and mosquitoes.* Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(5): p. 826-32.
32. 連日清, 臺灣蚊種檢索. 2004: 藝軒圖書出版社.
33. Lien, J.C., Weng, M.H., Lin, C.C., and Chin, C, *Biting midges of the genus Culicoides from Kinmen Is.* Journal of Taiwan Museum, 1996.
34. Lien, J.C., Weng, M.H., and Lin, C.C, *A revision of the genus Culicoides of Taiwan Part I Subgenus Trithecoides Diptera, Ceratopogonidae.* Journal of Taiwan Museum, 1997.
35. Lien, J.C., Weng, M.H., and Lin, C.C, *A revision of the genus Culicoides in Taiwan. Part II. Subgenus Avaritia (Diptera, Ceratopogonidae).* Journal of Taiwan Museum, 1998a.
36. Wirth, W.W., and Hubert, A.A, *The Culicoides of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae).* WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC, 1989.
37. Chen, C.S., *The genus Culicoides of Taiwan.* 1984.
38. Dallas, J.F., et al., *Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, Culicoides imicola, in Portugal, Rhodes and Israel.* Med Vet Entomol, 2003. **17**(4): p. 379-87.
39. Hebert, P.D., et al., *Biological identifications through DNA barcodes.* Proc Biol Sci, 2003. **270**(1512): p. 313-21.
40. Dobson, S.L., et al., *Characterization of Wolbachia host cell range via the in vitro establishment of infections.* Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(2): p. 656-60.

41. Karatepe, B., S. Aksoy, and M. Karatepe, *Investigation of Wolbachia spp. and Spiroplasma spp. in Phlebotomus species by molecular methods.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10616.
42. Teramoto, T., et al., *Infection of Aedes albopictus Mosquito C6/36 Cells with the wMelpop Strain of Wolbachia Modulates Dengue Virus-Induced Host Cellular Transcripts and Induces Critical Sequence Alterations in the Dengue Viral Genome.* J Virol, 2019. **93**(15).
43. Noda, H., T. Miyoshi, and Y. Koizumi, *In vitro cultivation of Wolbachia in insect and mammalian cell lines.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. **38**(7): p. 423-7.
44. Schultz, M.J., et al., *Variable Inhibition of Zika Virus Replication by Different Wolbachia Strains in Mosquito Cell Cultures.* J Virol, 2017. **91**(14).
45. McMeniman, C.J., et al., *Host adaptation of a Wolbachia strain after long-term serial passage in mosquito cell lines.* Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(22): p. 6963-9.
46. Teixeira, L., A. Ferreira, and M. Ashburner, *The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in Drosophila melanogaster.* PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. e2.
47. Martinez, J., et al., *Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of Wolbachia strains.* PLoS Pathog, 2014. **10**(9): p. e1004369.
48. Fytrou, A., et al., *Wolbachia infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence.* Proc Biol Sci, 2006. **273**(1588): p. 791-6.
49. Glaser, R.L. and M.A. Meola, *The native Wolbachia endosymbionts of Drosophila melanogaster and Culex quinquefasciatus increase host resistance to West Nile virus infection.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e11977.
50. Zélé, F., et al., *Wolbachia increases susceptibility to Plasmodium infection in a natural system.* Proc Biol Sci, 2014. **281**(1779): p. 20132837.
51. Skelton, E., et al., *A Native Wolbachia Endosymbiont Does Not Limit Dengue Virus Infection in the Mosquito Aedes notoscriptus (Diptera: Culicidae).* J Med Entomol, 2016. **53**(2): p. 401-8.
52. Hughes, G.L., et al., *Wolbachia strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite Plasmodium berghei in Anopheles gambiae mosquitoes.* Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(5): p. 1491-5.
53. Dodson, B.L., et al., *Wolbachia enhances West Nile virus (WNV) infection in the mosquito Culex tarsalis.* PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(7): p. e2965.
54. Comandatore, F., et al., *Supergroup C Wolbachia, mutualist symbionts of filarial nematodes, have a distinct genome structure.* Open Biol, 2015. **5**(12): p. 150099.
55. Kulkarni, A., et al., *Wolbachia pipientis occurs in Aedes aegypti populations in New Mexico and Florida, USA.* Ecol Evol, 2019. **9**(10): p. 6148-6156.
56. Carvajal, T.M., et al., *Detection of Wolbachia in field-collected Aedes aegypti mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines.* Parasit Vectors, 2019. **12**(1): p. 361.
57. Wong, M.L., et al., *Natural Wolbachia infection in field-collected Anopheles and other mosquito species from Malaysia.* Parasit Vectors, 2020. **13**(1): p. 414.
58. Ross, P.A., et al., *Loss of cytoplasmic incompatibility in Wolbachia-infected Aedes aegypti under field conditions.* PLoS Negl Trop Dis, 2019. **13**(4): p. e0007357.
59. Ross, P.A., et al., *Wolbachia Infections in Aedes aegypti Differ Markedly in Their Response to Cyclical Heat Stress.* PLoS Pathog, 2017. **13**(1): p. e1006006.

60. Goindin, D., et al., *Screening of natural Wolbachia infection in Aedes aegypti, Aedes taeniorhynchus and Culex quinquefasciatus from Guadeloupe (French West Indies).* Acta Trop, 2018. **185**: p. 314-317.
61. Carvajal, T.M., et al., *Detection and distribution of Wolbachia endobacteria in Culex quinquefasciatus populations (Diptera : Culicidae) from Metropolitan Manila, Philippines.* J Vector Borne Dis, 2018. **55**(4): p. 265-270.
62. Lefoulon, E., et al., *Pseudoscorpion Wolbachia symbionts: diversity and evidence for a new supergroup S.* BMC Microbiol, 2020. **20**(1): p. 188.

## 八、圖表

### (一)、台灣病媒傳染病之監測與特性分析

Table 1. 2020 年日本腦炎病媒蚊監測結果

**2020年病媒蚊採集**

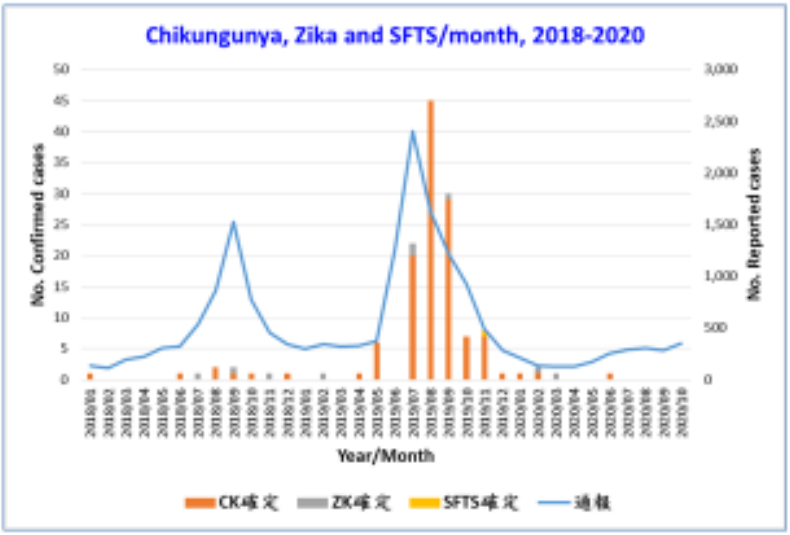
| | 採集日期 | 採集地點 | 蚊種 | 數量 | PCR+ |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2020/07//23-24 | 台北市北投區關渡自然公園 | 三斑家蚊 | 750 (15 pools) | TMUV+ (1 pool) |
| | | | 環紋家蚊 | 177 (4 pools) | JEV+(GI) (1 pool) |
| | | | 多斑瘧蚊 | 100 | |
| | | | 斑腳沼蚊 | 100 | |
| | | | 白肩斑蚊 | 50 | |
| | | | 越永家蚊 | 45 | |
| | | | 白腹叢蚊 | 4 | |
| | | | 白線斑蚊 | 3 | |
| | | | 熱帶家蚊 | 3 | |
| | | | 袋蓮叶蚊 | 2 | |
| | | | 澎湖斑蚊 | 1 | |
| | 2020/08/20-21 | 台北市北投區關渡自然公園 | 三斑家蚊 | 1850 (37 pools) | |
| | | | 環紋家蚊 | 300 (5 pools) | |
| | | | 斑腳沼蚊 | 50 | |
| | | | 越永家蚊 | 15 | |
| | | | 白肩斑蚊 | 14 | |
| | | | 袋蓮叶蚊 | 6 | |
| | | | 熱帶家蚊 | 1 | |

**共採集3,471隻病媒蚊，分為78 池，其中1池JEV PCR(+)，1池Tembusu virus PCR (+)。**

10

Figure 1. 境外移入屈公病及茲卡病毒感染症之監測

# 屈公病及茲卡病毒感染症之監測




| | 2018 | 2019 | 2020 Jan-Oct |
|---|---|---|---|
| 通報 | 5790 | 9865 | 2243 |
| DN確定 | 529 | 641 | 130 |
| CK確定 | 7 | 116 | 3 |
| ZK確定 | 3 | 4 | 2 |
| SFTS確定 | 0 | 1 | 0 |

Figure 2. Phylogenetic tree of CHIKV (3747 nts)

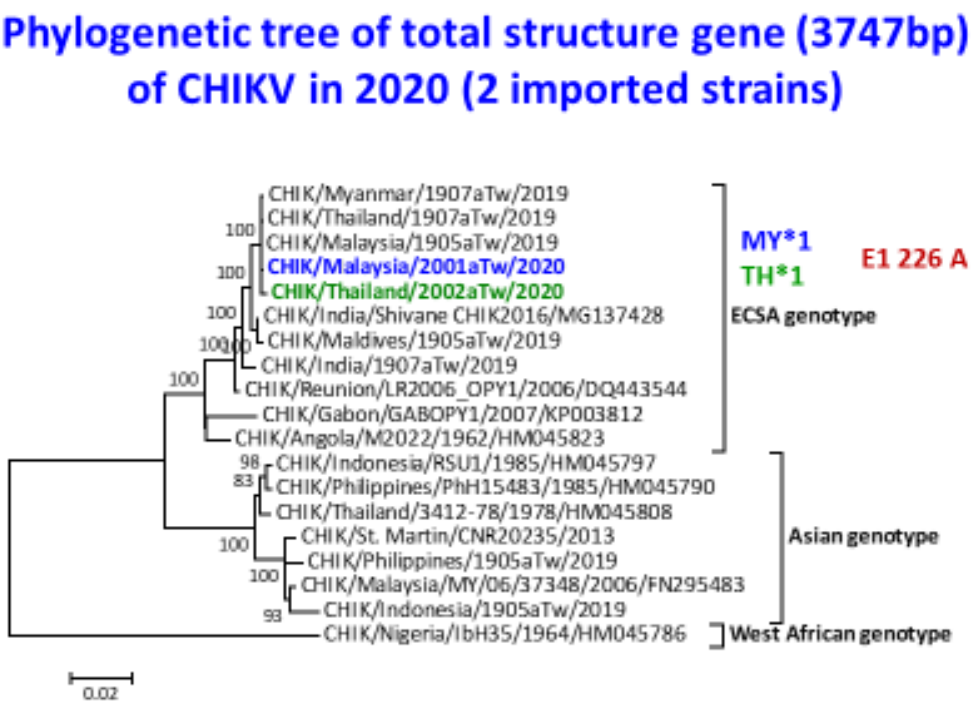
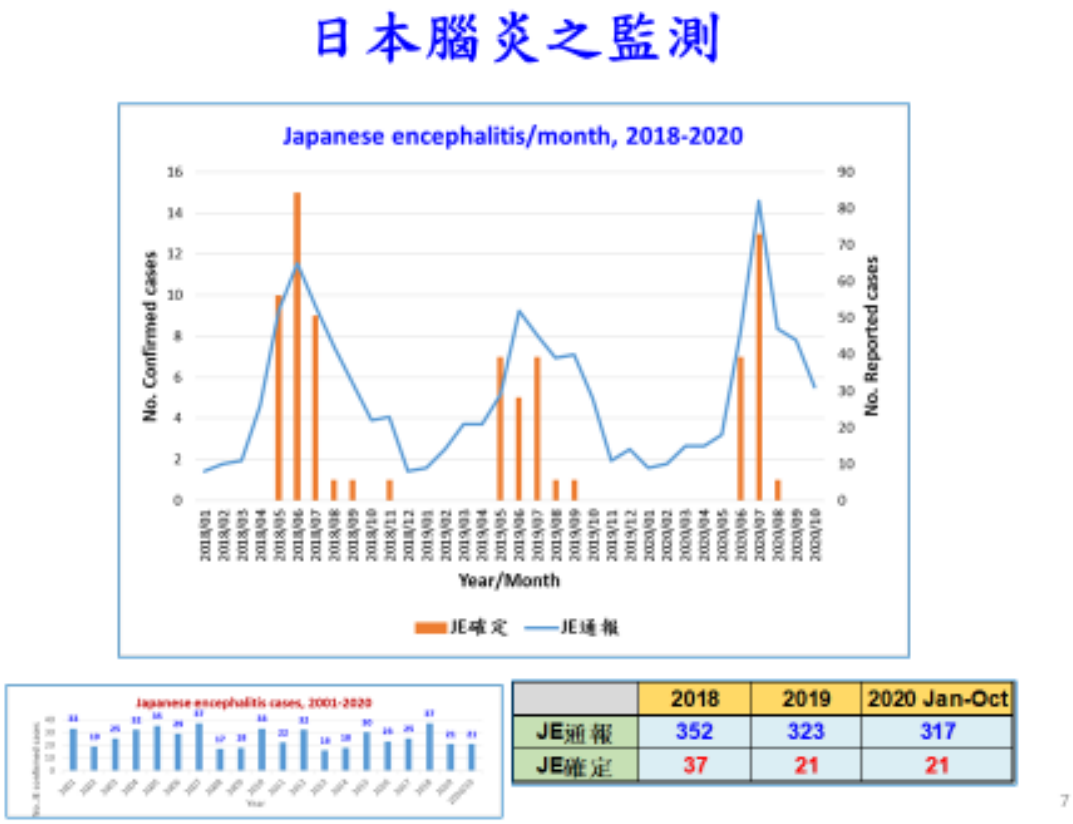


Figure 3. 日本脳炎之監測




| | 2018 | 2019 | 2020 Jan-Oct |
|---|---|---|---|
| JE通報 | 352 | 323 | 317 |
| JE確定 | 37 | 21 | 21 |

7

Figure 4. 日本腦炎病例之分布

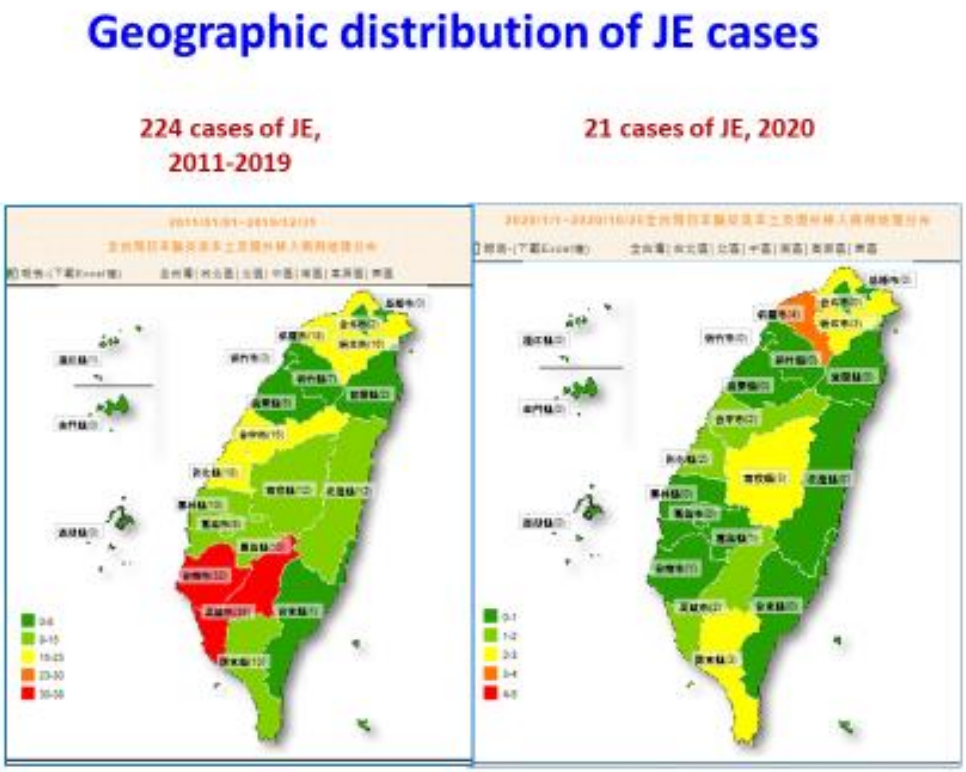


Figure 5. 日本脑炎病例的年龄分布

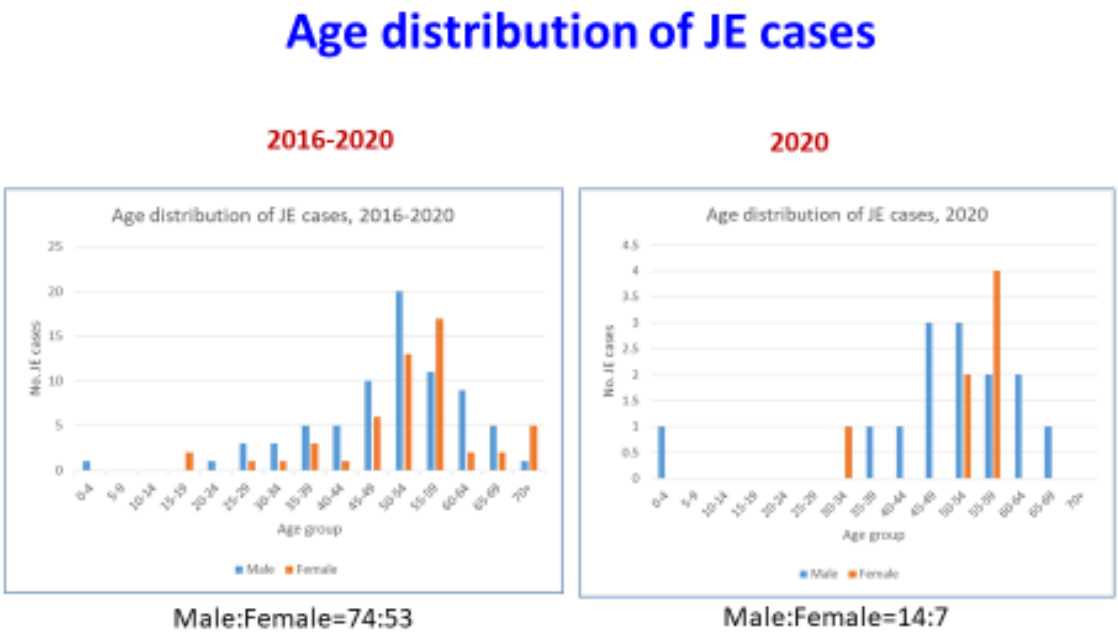


Figure 6. 漢他病毒感染症之監測

| | 2018 | 2019 | 2020 Jan-Oct |
|---|---|---|---|
| HAN通報 | 38 | 44 | 130 |
| HAN確定 | 1 | 3 | 11 |

11

Figure 7. 漢他病毒感染症之病例分布

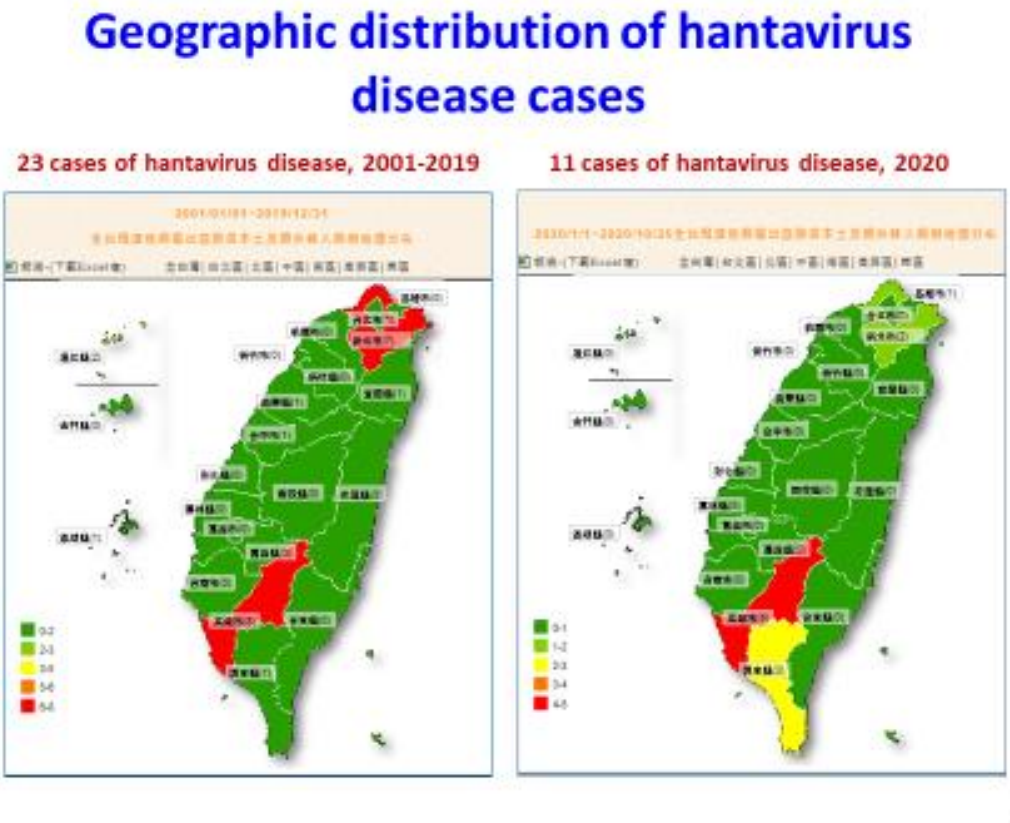
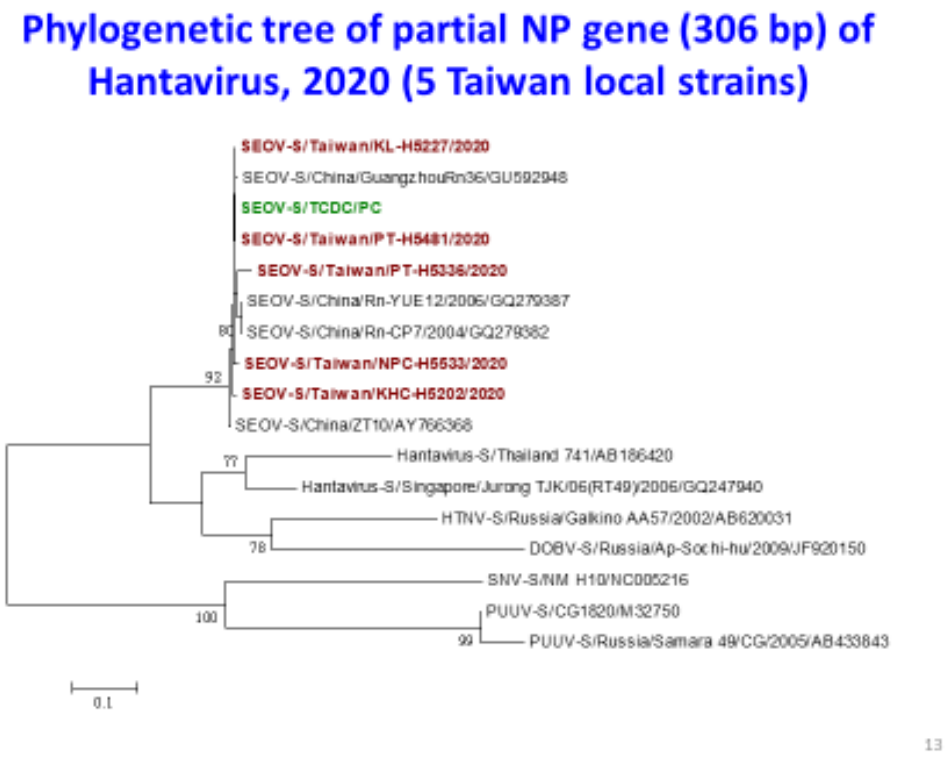


Fig 8. Phylogenetic tree of Hantavirus



## (二) 、開發檢測 arbovirus 的整合型快速檢測試劑

表一、 製備之重組蛋白與單株抗體

| Recombinant protein(CDC) | |
|---|---|
| Baculovirus systm | E.Coli sysyem |
| CHIK E1/E2 341 | CHIK E2 341 |
| ZIK NS1 | ZIK E DIII/ Full |
| JE E Full | - |
| DEN NS1/ E Full /tetra EDIII | DEN E Full/tetra EDIII |

| | Monoclonal antibody | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **DEN NS1** | D1-1E5.1 | D1-1F7.1 | D2-10H1 | D3-10B1 | D4-19E |
| | Mix- D2/8-1 | Mix- 1F3.1 | Mix- 4D5.110 | | |
| **ZIK Envelope** | ZK E-4E10 | | | | |
| **ZIK NS1** | 3A1.1 | 2G8.1 | 2D9 | 4H4 | 3C9.1 |
| **CHIK Envelope** | CKE1-5C5.2 | CKE1-E3.2.1 | CK E2-4A1.1 | CK E2-1B1.2.1 | CK E2-4F4.3 |
| **anti-flavivirus** | D56 | 6G11 | | | |

**Fig 1.** 利用原核生物系統表現及生產 Chikungunya virus E 2 重組蛋白

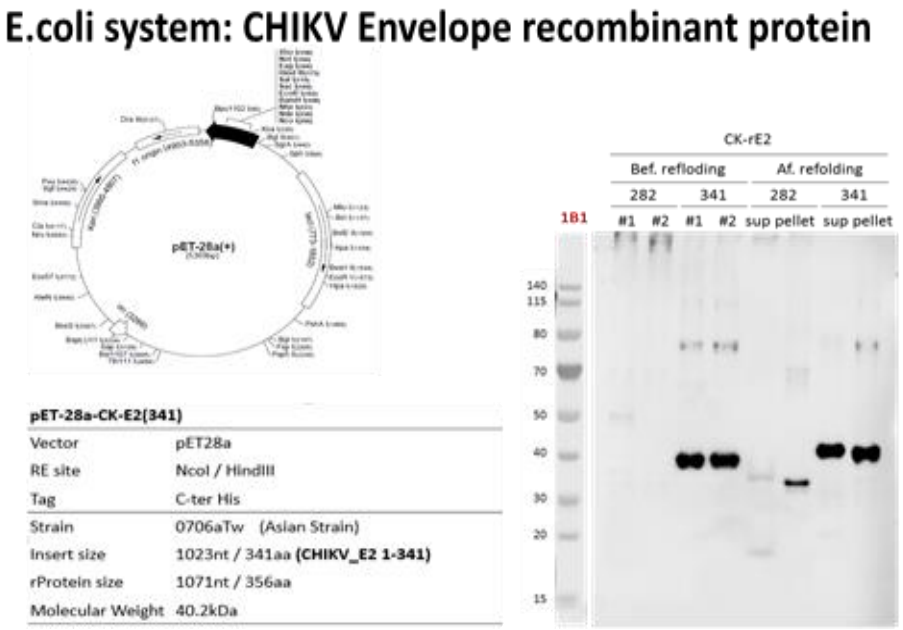
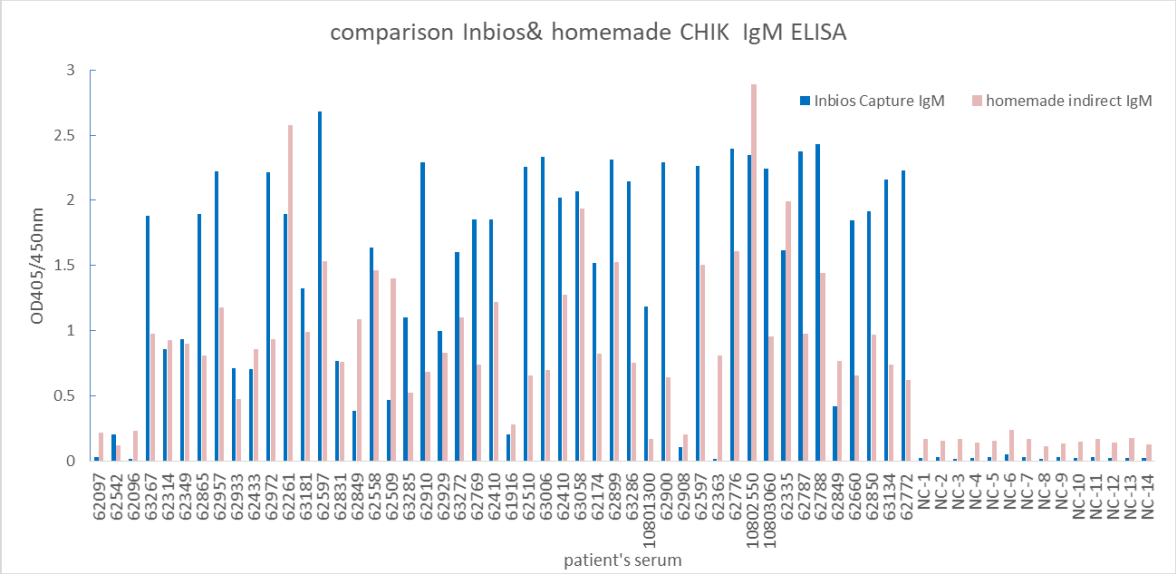


**Fig 2.** 利用原核生產的屈公病 E2 重組蛋白組成屈公病酵素免疫分析試劑及與其他市售品牌屈公病酵素免疫分析試劑之比較




| Days after onset | patient n | Inbios captureIgM ELISA | | homemade indirect IgM/IgG ELISA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | patient n | % | patient n | % |
| 5-10 days | 17 | 14 | 82.4 | 14 | 82.4 |
| 11-15 days | 16 | 15 | 93.8 | 15 | 93.8 |
| >15 days | 15 | 14 | 93.3 | 14 | 93.3 |
| Total | 48 | 43 | 89.6 | 43 | 89.6 |
| negative | 14 | 14 | 100 | 14 | 100 |

**Fig .3** 以恢復期屈公病陽性血清測試屈公病 IgM/IgG 抗體檢測試劑

| sample No(Ct) | 61966 (26) | 63012 (27) | 60172 (28) | 62257 (28) | 62314 (30) | 62957 (36) | 62929 (IgM+) | 62880 (IgM+) | 62902 (IgM+) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IgM/IgG ICT | - /- | - /- | - /- | +/- /- | +/+/- | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| | | | | | | | | | |

**Fig 4.**篩選抗體

| mAb Ascites | Isotype | Ag coating ELISA | | | | | 1FA | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CHIK(Asia) | CHIK(Africa) | rE1 | rE2 | rD2 NS1 | CHIK(Asia) | CHIK(Africa) |
| CK 5C5.2.3 | IgG1,k | 2.709 | 2.564 | 2.896 | 0.063 | 0.075 | +++ | +++ |
| CK 1E3.2.1 | IgG1,k | 2.707 | 2.476 | 3.162 | 0.075 | 0.091 | +++ | +++ |
| CK 4A1.1 | IgG1,k | 2.51 | 2.219 | ND | ND | ND | +++ | +++ |
| CK 4A1.2 | IgG2a,k | 2.51 | 2.219 | ND | ND | ND | +++ | +++ |
| CK 1B1.1.2.1 | IgG2a,k | 2.505 | 2.21 | 0.114 | 0.082 | 0.131 | +++ | +++ |
| CK 4F4.3 | IgG1,k | 3.045 | 2.33 | ND | ND | ND | +++ | +++ |
| PC(10-8G) | IgG2b,k | 1.903 | 2.047 | 0.09 | 1.772 | 0.07 | +++ | +++ |
| PC(15-7C) | IgG2a,k | 1.134 | 1.174 | 0.058 | 1.115 | 0.108 | +++ | +++ |
| PC(3581) (anti-Alphavirus) | | 1.746 | 0.702 | 0.145 | 0.173 | ND | ++ | ++ |

**Fig 5.** 分析抗體-抗原間的親和性

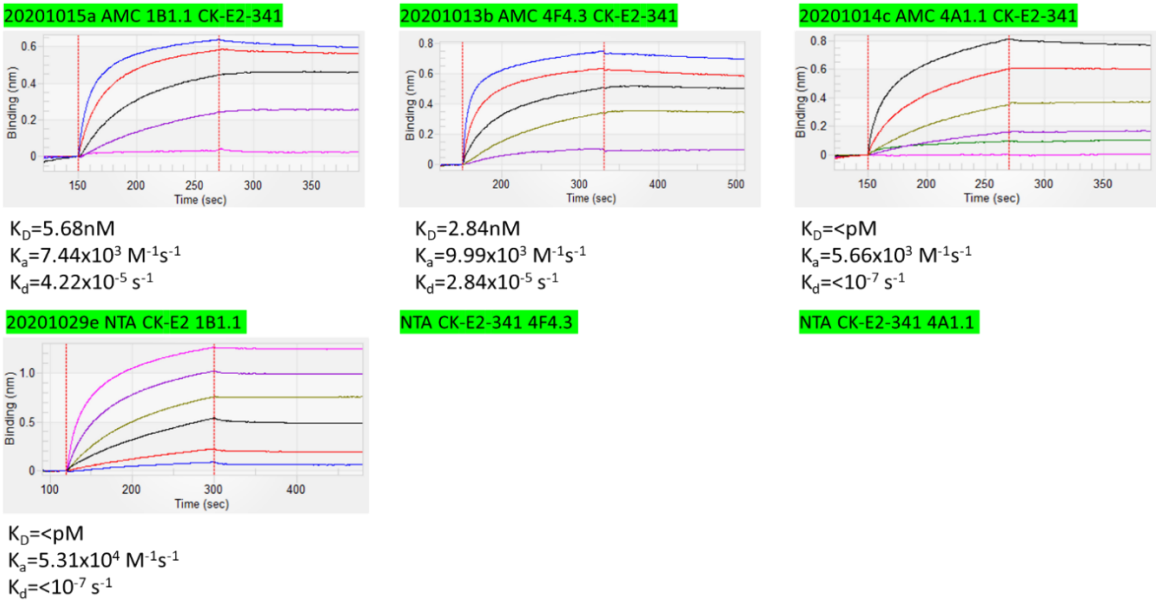



**Fig 6.**抗體的配對組合

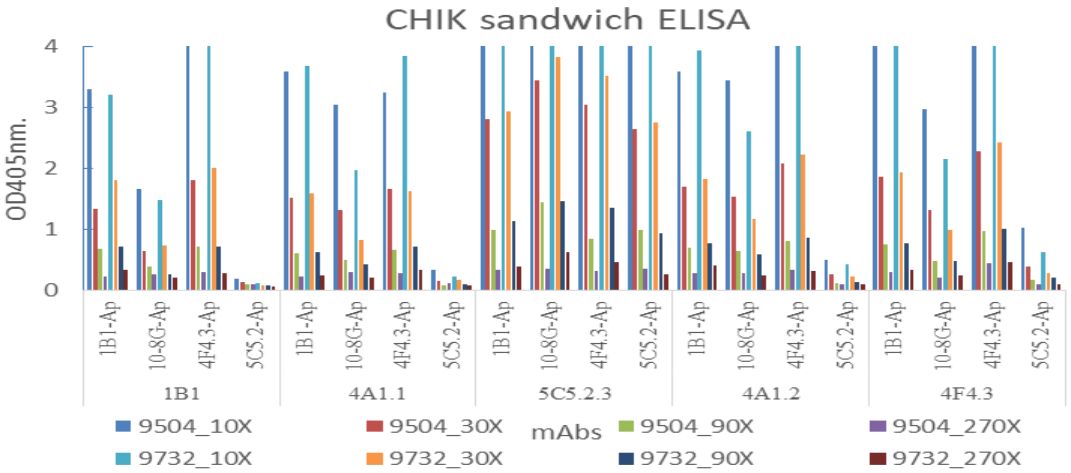
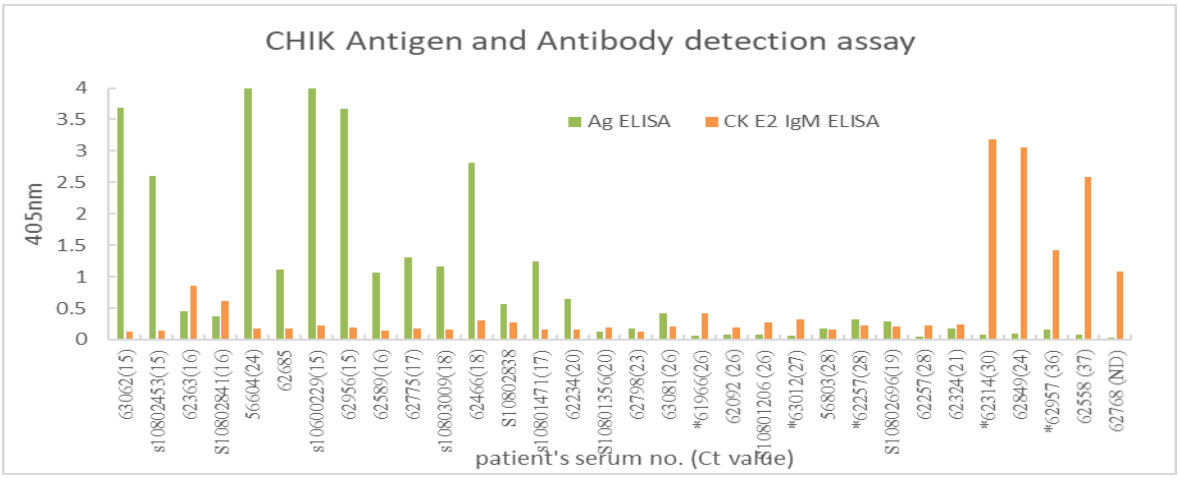


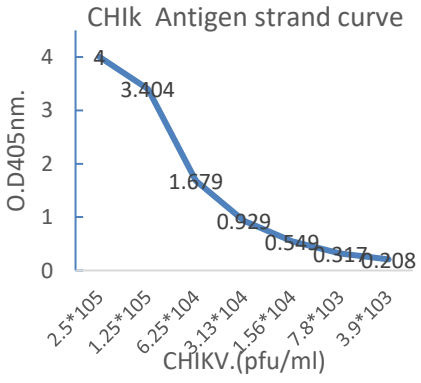
**Fig 7.**組成抗原檢測試劑進行臨床檢體測試




*表示有進行 E2 ICT 檢測

| onset day | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | >5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| case number | 6 | 11 | 6 | 3 | 1 | 5 |
| postive umber in RT-PCR | 6 | 11 | 6 | 3 | 1 | 2 |
| positive number in Ag ELISA | 6 | 9 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| positive numberin E2 ELISA | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 |

**Fig 8.** 偵測屈公病抗原 ICT 之 sensitivity 與 LOD



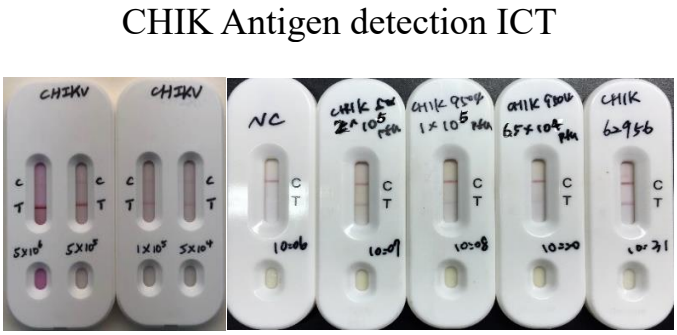
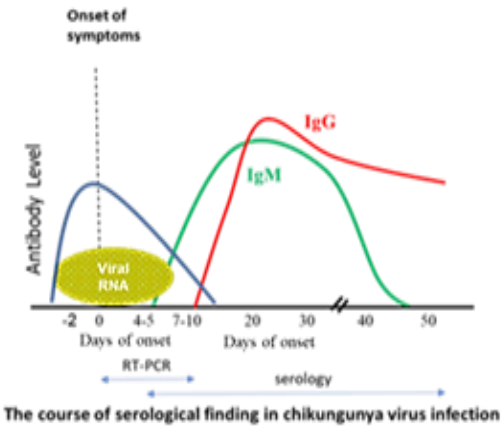



**Fig 9.**屈公病抗原及 IgM/IgG 抗體的檢測時程




The course of serological finding in chikungunya virus infection

| ID | 61386 | S10801924 | 62036 | 62092 | 63062 | 62097 | 62079 | 62831 | 62849 | 62509 | 62510 | NC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| onset day | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| RT-PCR(Ct) | 15 | 20 | 18 | 26 | 15 | 19 | 37 | 37 | 24 | ND | ND | ND |
| ELISA | - | - | - | - | - | - | IgM+ | IgM+ | IgM+ | IgM/IgG+ | IgM/IgG+ | - |
| Antigen detection(ICT) | +/- | + | + | - | + | + | + / - | - | - | + | - | - |
| IgM/IgG detection(ICT) | - | - | - | - | - | - | + / - | +/- /- | + / - | + / +/- | +/- / +/- | - |

**Fig 10.** 組成屈公病抗原及抗體 combo ICT 進行臨床血清檢體評估

| Days after onset | patient n | Antigen | | IgM/IgG | | Both Ag and/or Ab | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | patient n | % | patient n | % | patient n | % |
| 0-5 days | 24 | 13 | 54.2 | 3 | 12.5 | 16 | 66.7 |
| 6-10 days | 17 | 9 | 52.9 | 17 | 100 | 17 | 100 |
| 11-15 days | 12 | 3 | 25 | 11 | 91.6 | 12 | 91.7 |
| >15 days | 9 | 0 | 0 | 8 | 88.9 | 8 | 88.9 |
| Total | 62 | 25 | 40.3 | 39 | 62.9 | 53 | 85.5 |

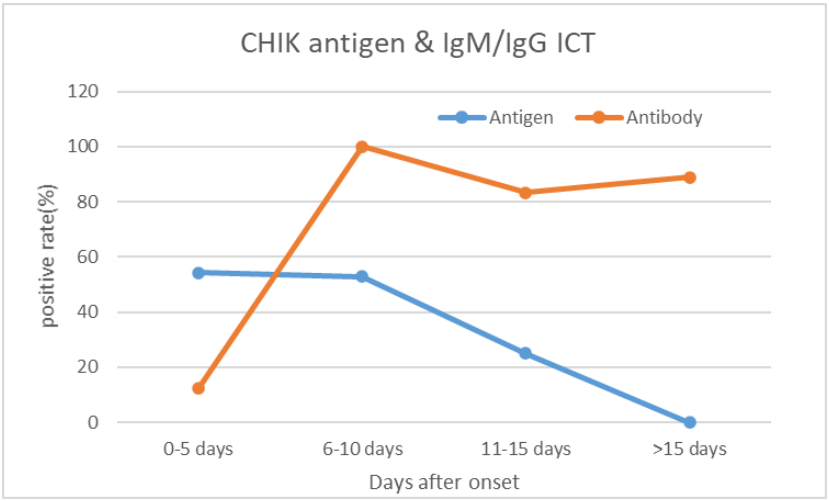


**Fig 11.**與市面上偵測屈公病抗體的快速檢驗試劑做比較

Performance of homemade and CTK rapid test to detect CHIK

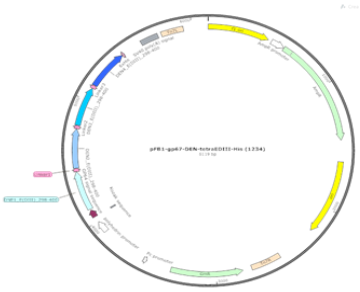
| | percentage | |
|---|---|---|
| Ab ICT | homemade | CTK |
| sensitivity | 73% | 67% |
| specificity | 96% | 100% |
| overall agreement | 84% | 82% |

**Fig 12.** 利用真核生物系統表現 Dengue tetra-EDIII 重組蛋白

**Expression and purification of recombinant DEN Antigen**

**Bac system: tetravalent DENV-rEDIII$^{1234}$ Cloning**

| pFastBac1-DEN-tetraEDIII$^{1234}$ | |
|---|---|
| Vector | pFastBac1 |
| RE site | BamHI / XhoI |
| Tag | C-ter His |
| Strain | DENV1-4 |
| Insert size | 312nt / 104aa **(tetravalent DENV_EDIII 298-400)** |
| rProtein size | 1350nt / 449aa |
| Molecular Weight | 43kDa |
| Primer Forward | CATCGGGCGCGGATCGCCACCATGGTAAGCGCTATTG |
| Primer Reverse | GTACCGCATGCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGC |



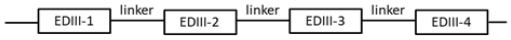



**Fig 13.**組成登革熱 tetra-E DIII 蛋白酵素免疫分析試劑進行血清檢體檢測

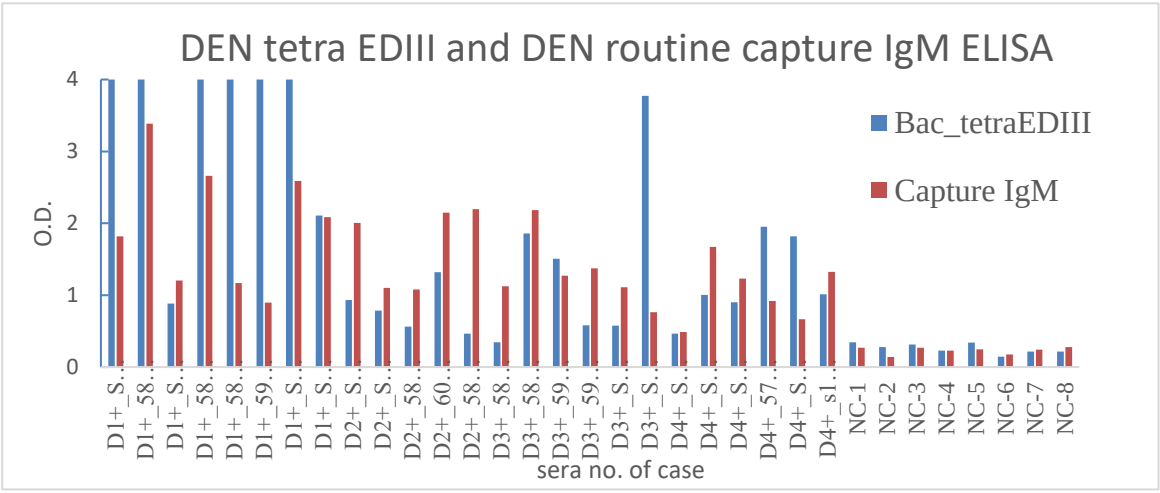
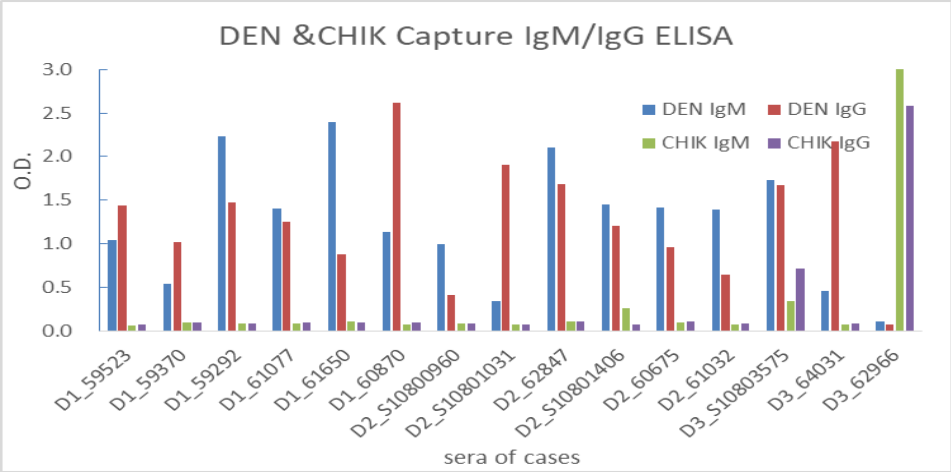


**Fig 14.** 組成登革熱 IgM/IgG 抗體快速檢測試劑

## (1) Dengue Capture IgM/IgG ELISA



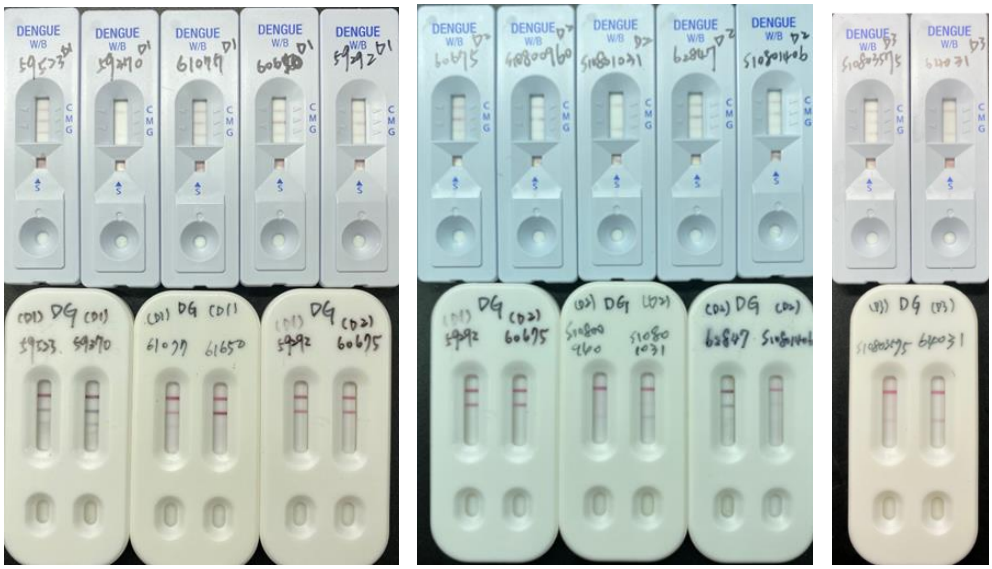

## (2) Dengue tetra-EDIII recombinant protein IgM/IgG rapid test

| | | | Performance assay: ELISA test | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Dengue type | positive | negative | |
| home-made Dengue IgG/IgM | positive | DEN-1 | 6 | 0 | 6 |
| | | DEN-2 | 6 | 0 | 6 |
| | | DEN-3 | 2 | 0 | 2 |
| | | DEN-4 | 0 | 0 | 0 |
| | negative | | 1 | 6 | 7 |
| | Total | | 15 | 6 | 21 |

## (3) Commercial SD Dengue IgM/IgG rapid Test

| | | Dengue type | Performance assay: ELISA test | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | positive | negative | |
| SD Dengue IgG/IgM | positive | DEN-1 | 6 | 0 | 6 |
| | | DEN-2 | 6 | 0 | 6 |
| | | DEN-3 | 2 | 0 | 2 |
| | | DEN-4 | 0 | 0 | 0 |
| | negative | | 1 | 6 | 7 |
| | Total | | 15 | 6 | 21 |

**(i) Comparison of commercial SD and homemade Dengue IgM/IgG rapid Test Positive sera**

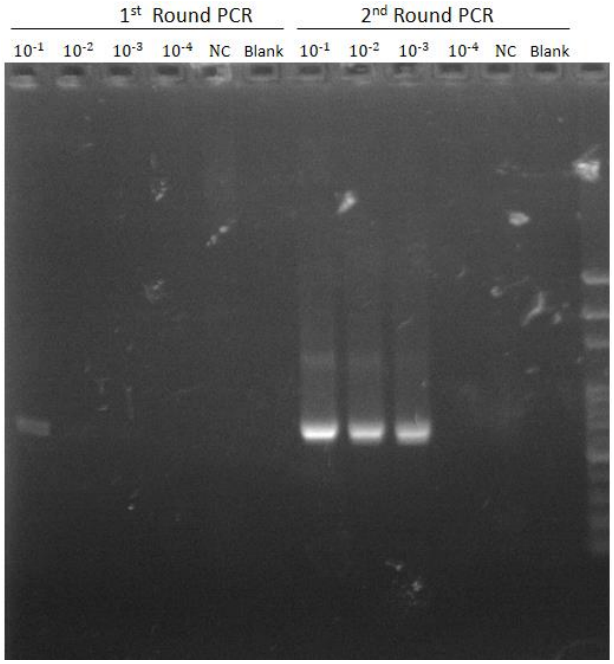



**(ii) Negative sera**

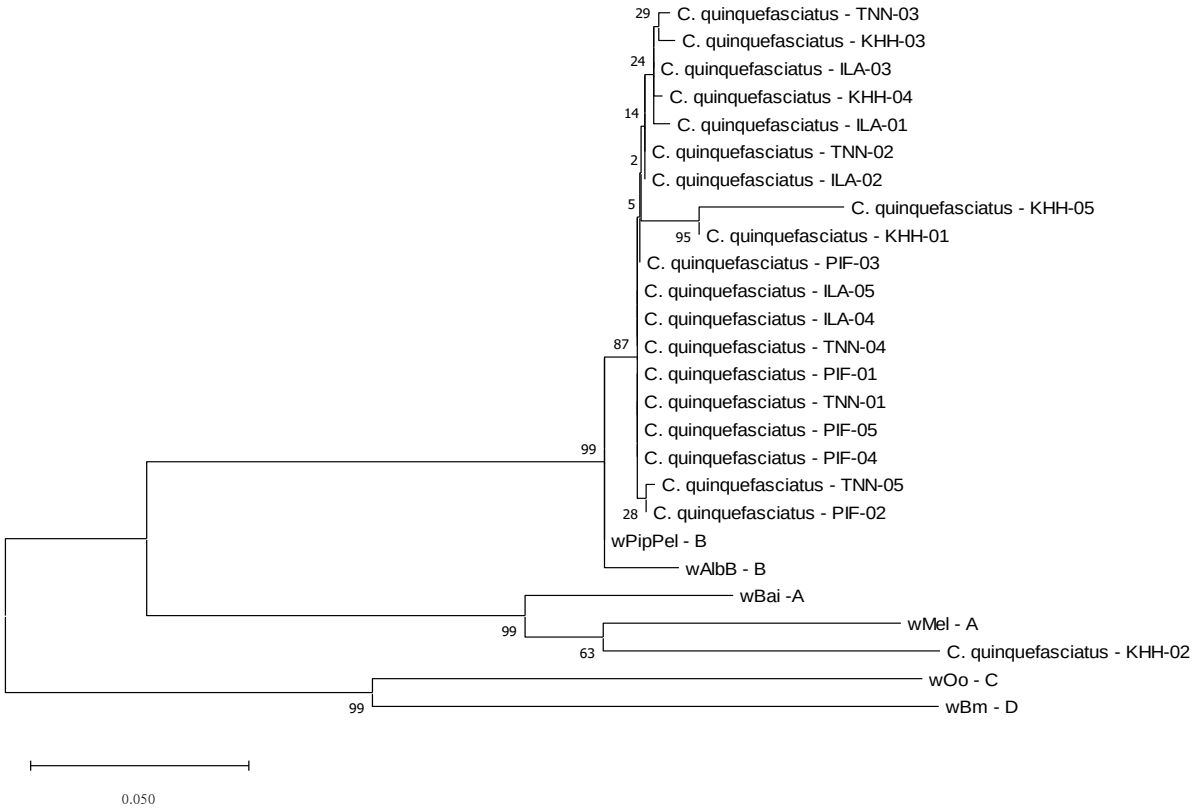
## (4) Dengue & Chikungunya Combo Rapid Test

**Fig 15.** 登革熱 NS1 &IgM/IgG combo 抗體快速檢測試劑
DengueNS1/serotyping NS1 &IgM/IgG combo Rapid Test

## (三)、沃爾巴克氏菌對節肢病毒之效果評估

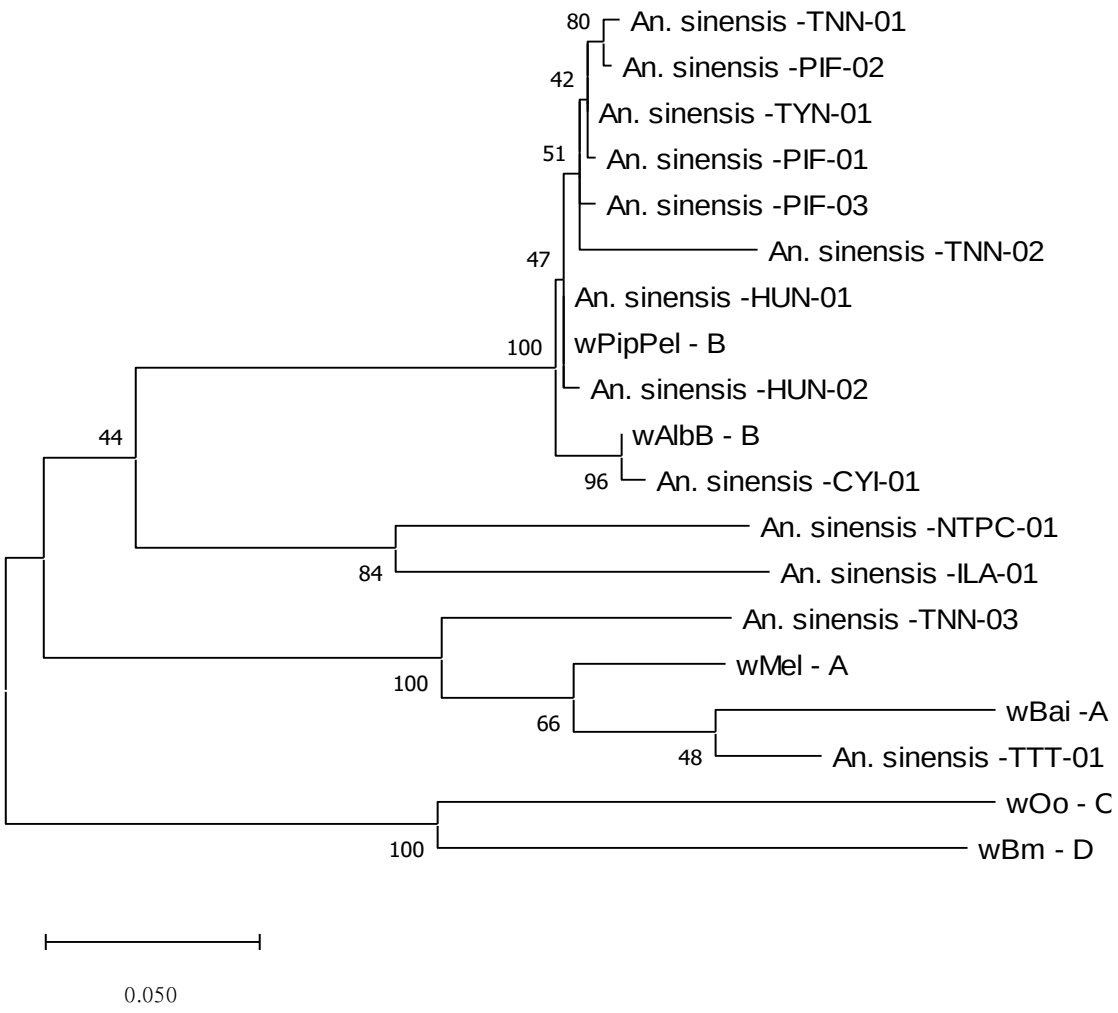



**圖一、實驗室設計之 wsp Nested-PCR 引子的偵測極限：** 實驗室使用 wsp-37F 與 wsp-681R 進行第一輪 30 個循環增幅放大 （1st Round PCR），再使用 wsp-81F 與 wsp-678R 進行第二輪再 30 個循環增幅放大（2nd Round PCR）。第一次 PCR 後，檢測極限為 DNA 稀釋 10 倍，為 100 個 copy，且訊號微弱。經過第二次 PCR 增幅後，檢測極限提昇至 DNA 稀釋 1,000 倍，為 1 個 copy，且訊號仍強。（單隻白線斑蚊 DNA 與實驗室設計含 wsp 基因片段之陽性對照組質體進行校正，單隻白線斑蚊 DNA 含有約 1,000 copy/ μl 的 *Wolbachia*。）



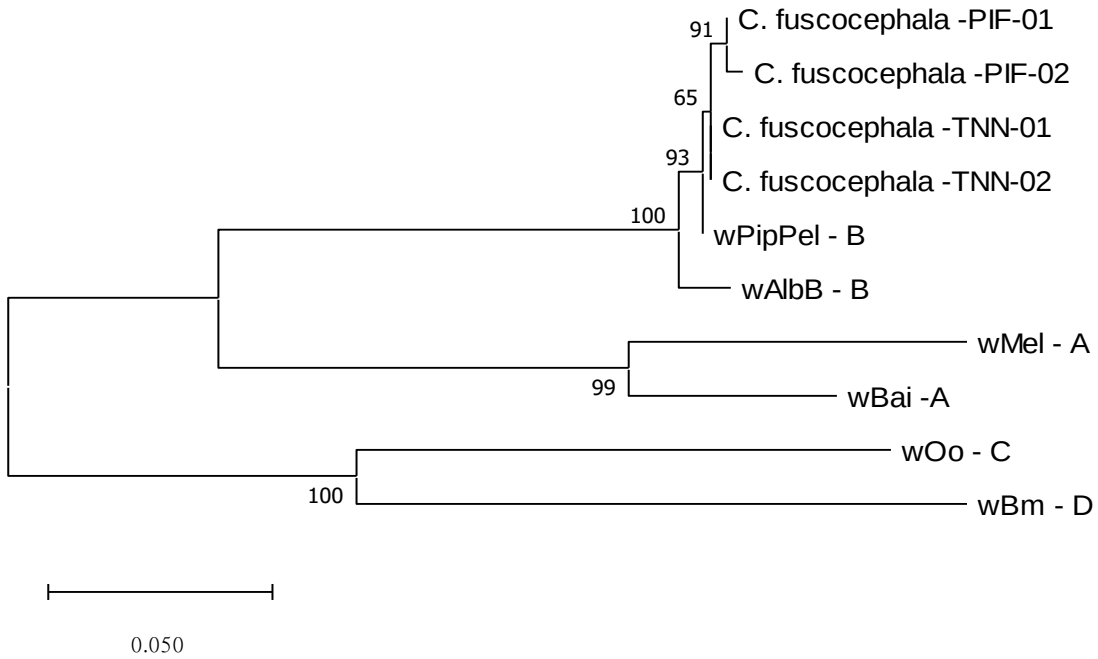

**圖二、感染熱帶家蚊的 *Wolbachia* 其 wsp 基因經序列比對結果製作演化樹**

ILA：宜蘭、TNN：台南、PIF：屏東、KHH：高雄



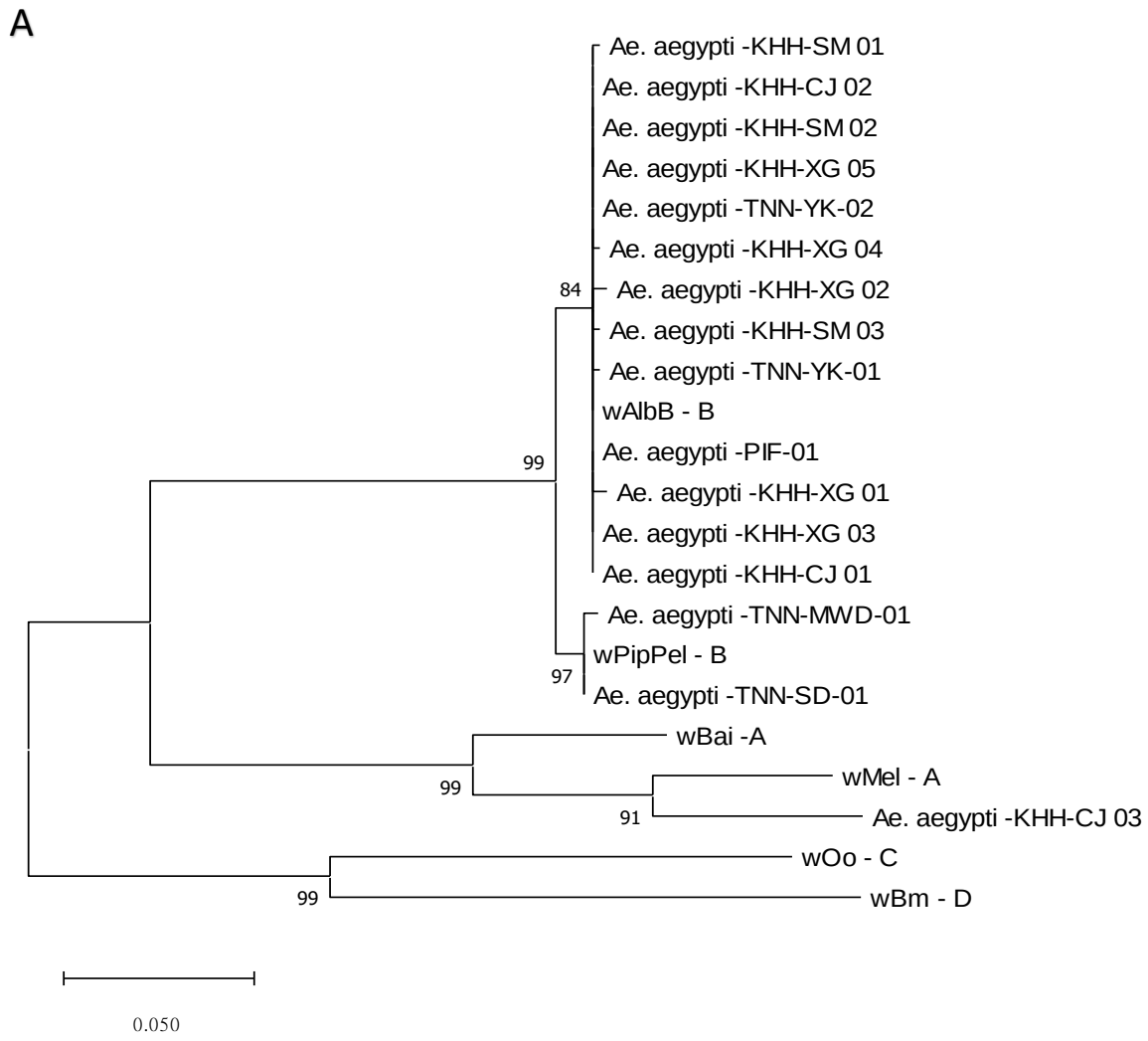

**圖三、感染中華瘧蚊的 *Wolbachia* 其 wsp 基因經序列比對結果製作演化樹**

(ILA：宜蘭、TNN：台南、PIF：屏東、HUN：花蓮、TYN：桃園、CYI：嘉義、NTPC：新北、TTT：台東)

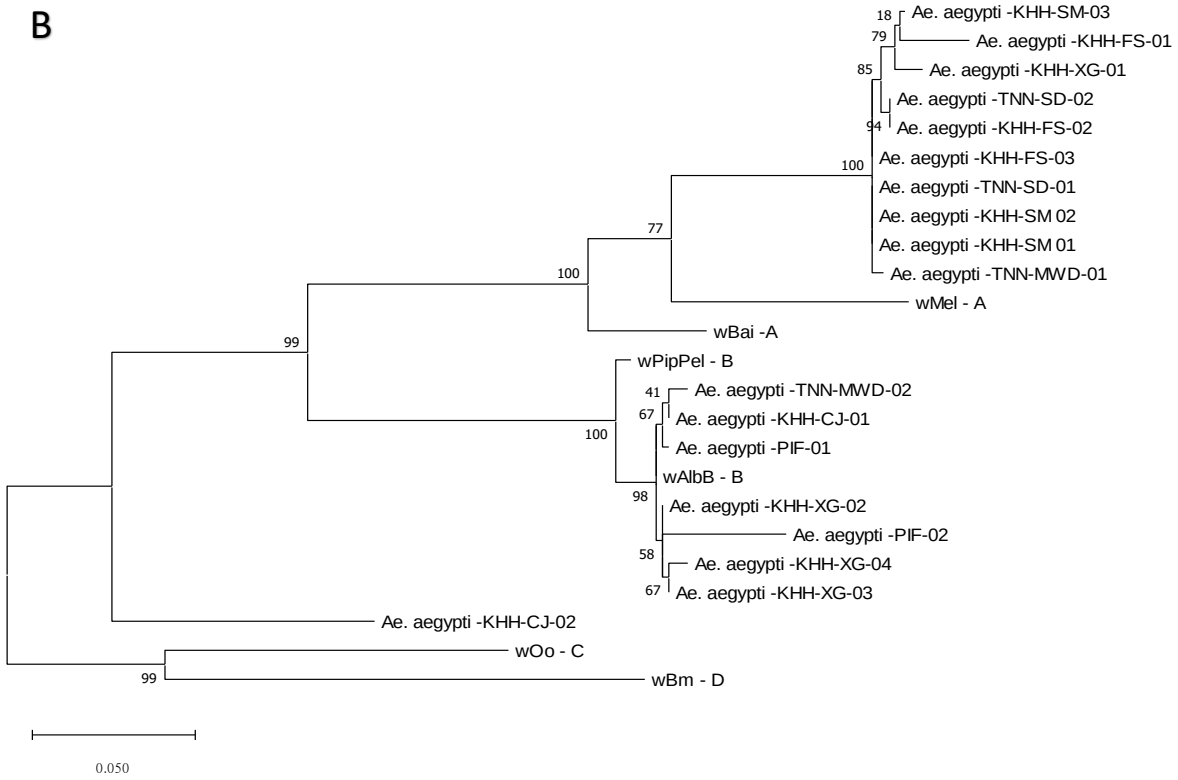



**圖四、感染白頭家蚊的 *Wolbachia* 其 wsp 基因經序列比對結果製作演化樹**

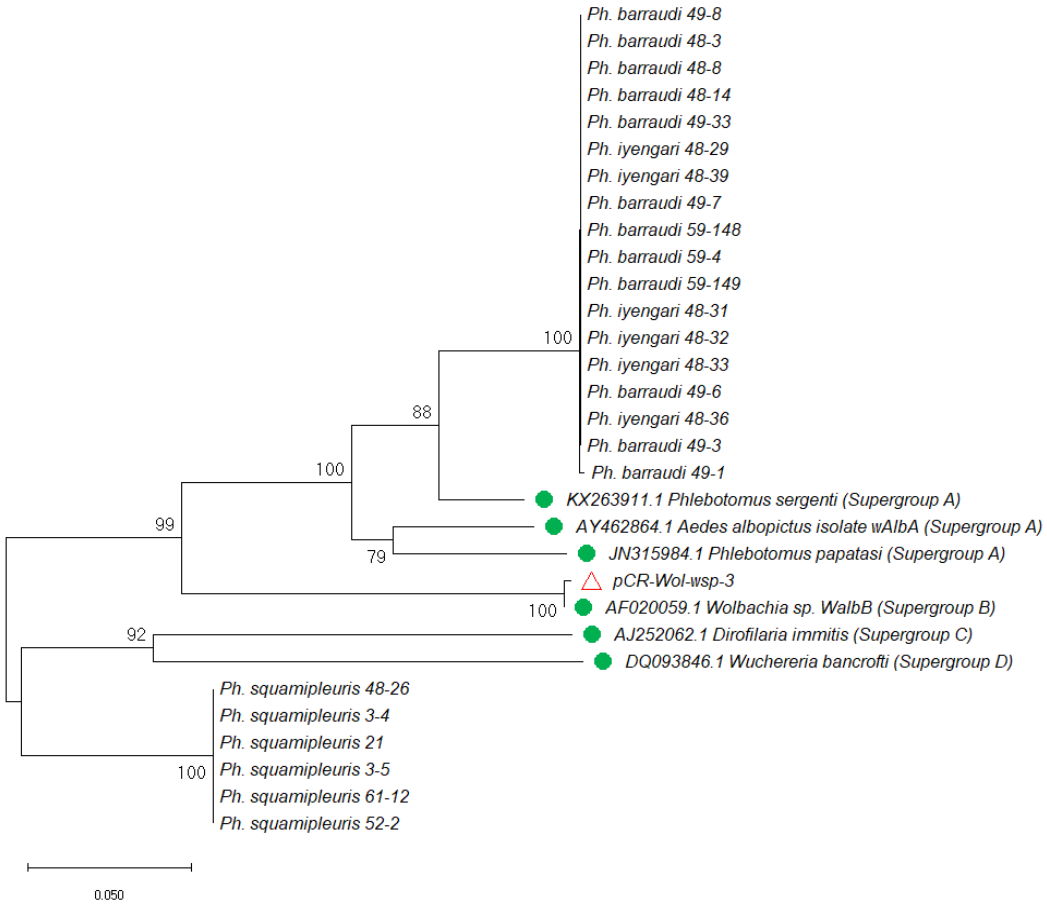
(TNN：台南、PIF：屏東)




**圖五 A、2016 年感染埃及斑蚊的 *Wolbachia* 其 wsp 基因經序列比對結果製作演化樹** (TNN：台南、YK：永康區、SD：南區、MWD：中西區、KHH：高雄、SM：三民區、XG：小港區、CJ：前鎮區、PIF：屏東)




**圖五 B、2020 年感染埃及斑蚊的 *Wolbachia* 其 wsp 基因經序列比對結果製作演化樹** (TNN：台南、YK：永康區、SD：南區、MWD：中西區、KHH：高雄、SM：三民區、XG：小港區、CJ：前鎮區、PIF：屏東)




**圖六、臺灣野外白蛉所帶 *Wolbachia* 其 *wsp* 之基因樹分析**。綠色圓點為 NCBI 參考基因序列，紅色三角形為陽性對照組序列，以 Neighbor-Joining method，bootstrap 值 1000。

表一、執行 *Wolbachia* 檢測的蟲媒種類及數量明細表 （單位：隻）

| | 新北市 | 桃園市 | 嘉義縣 | 臺南市 | 高雄市 | 屏東縣 | 臺東縣 | 花蓮縣 | 宜蘭縣 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 熱帶家蚊 | - | - | - | 5 | 5 | - | - | 5 | 5 |
| 三斑家蚊 | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - |
| 白頭家蚊 | - | - | - | 5 | 5 | 8 | - | - | - |
| 中華瘧蚊 | 5 | 5 | 5 | 5 | - | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 矮小瘧蚊 | - | - | - | 10 | - | 3 | - | - | - |
| 埃及斑蚊 2016 | - | - | - | 30 | 40 | 10 | - | - | - |
| 埃及斑蚊 2020 | | | | 25 | 40 | 10 | | | |

表二、*Wolbachia* 於蚊蟲蟲媒中的盛行率

| 蚊種 | 檢測數 （隻） | wsp 陽性 （隻） | Netsed - wsp 陽性 （隻） | 陽性率 |
|---|---|---|---|---|
| 熱帶家蚊 | 20 | 13 | 19 | 95.0 % |
| 三斑家蚊 | 5 | 0 | 0 | 0.0 % |
| 環紋家蚊 | - | - | - | - |
| 白頭家蚊 | 18 | 1 | 4 | 22.2 % |
| 中華瘧蚊 | 40 | 3 | 13 | 32.5 % |
| 矮小瘧蚊 | 13 | 0 | 0 | 0.0 % |
| 埃及斑蚊 | 155 | 0 | 34 | 21.9 % |
| 白線斑蚊 | - | - | - | - |

表三、臺灣野外白蛉 *Wolbachia* 帶菌情形

| 蚊種 | 檢測數 （隻） | wsp 陽性 （隻） | Netsed - wsp 陽性 （隻） | 陽性率 |
|---|---|---|---|---|
| *Ph. iyengari* | 71 | 14 | 21 | 29.6 % |
| *Ph. barraudi* | 33 | 11 | 16 | 48.5 % |
| *Ph. squamipleuris* | 11 | 6 | 7 | 63.6 % |
| *Phlebotominae* sp. | 7 | 0 | 2 | 28.6 % |
| Total | 122 | 31 | 46 | 37.7 % |

# 109 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：109.12.16

*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 | 完成通報及檢驗的病例，達成年度工作目標。 | 謝謝委員建議與肯定。 | 無 |
| 2 | ICT 的表現與國際相當，應由獨立單位確認結果。 | 謝謝委員建議，未來將由第三獨立單位確認驗證結果。 | 無 |
| 3 | *Wolbachia* 的分布在埃及斑蚊測得到，三斑家蚊則無。 | 本研究設計高敏感性 *Wolbachia* 分子生物學檢測方法，偵測極限為傳統 PCR 的 100 倍，並首度於埃及斑蚊體內測到低密度的 *Wolbachia* 感染，其陽性率為 22 %，三斑家蚊則無測到。 | 無 |
| 4 | 針對今年登革熱侷限於北部，是否為境外移入相關或可能為本土疫情，請補充說明之。 | 截至目前(11/26)為止，北部地區共有 71 例本土登革熱病例，由病例分離出之病毒株均為第一型登革病毒，且基因序列均相同。病毒之結構基因序列比對結果與近年越南境外移入病毒株序列最相近，與台灣過去流行的病毒株基因序列均不同，推測病毒為今年自越南境外移入後在本土造成疫情。 | 無 |

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日

前至 GRB 系統完成資料抽換。