

計畫編號：DOH95-DC-2026

行政院衛生署疾病管制局九十五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(第二年)

## 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、張梅君

執行期間： 95 年 1 月 1 日至 95 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 (Beatty & 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、白肋斑蚊等常見蚊種。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, Boom et al. 2003, Traore-Lamizana et al. 2001)。由蚊蟲傳播引起人腦炎的節肢病毒分屬於 the Togaviridae (genus Alphavirus)(東方馬腦炎、西方馬腦炎、委內瑞拉馬腦炎)、黃病毒科 Flaviridae(黃病毒屬日本腦炎、聖路易斯腦炎、牟谷腦炎)及 Bunyaviridae (La Crosse encephalitis)。以上病毒腦炎均為人畜共通疾病，擁有非常複雜的生活史，其中包括非人類的脊椎動物及病媒蚊。因為病媒蚊的存在，提供了人發生此類疾病的事前感染風險評估機會。若能直接偵測病媒蚊體內病毒種類及活動，則可適時提出警訊，例如美國 CDC 就有一套完整的節肢病毒監測計畫 (Moore et al. 1993)，而澳洲北部也曾大規模篩選蚊蟲體內帶黃病毒屬病毒(Van der Hurk et al. 2002)。目前分子生物的技术已被廣泛用在單種疾病監測，但為了節省成本及人力，節肢病毒亦有針對一群疾病尋找共同探針 (universal primers for a group of diseases in a single PCR)進行研究，並發展出兩段式策略，第一階段用較廣的共同探針篩選出可能的病毒群，第二階段再用單種病毒探針 (species-specific primers) 鑑定 (Kuno 1998, Bronzoni et al. 2005)。此共同探針再配合蚊蟲磨碎前處理機器、全自動 RNA 萃取機器及 Real time PCR 的一連貫作業流程，將可大量、及時且便宜的定期篩檢病媒蚊檢測台灣地區病媒蚊體內帶病毒活動情形。

傳播腦炎性節肢病毒的病媒蚊種類很多，習性亦有所不同，使用不同的捕蚊器 (Anderson et al. 2004, Falco et al. 2002, Mboera et al. 2000)，放置的高度 (Russell & Hunter 2005) 會吸引不同種類的蚊蟲。一般使用的捕蚊器包括美國 CDC 捕蚊燈(配合乾冰)、孕母捕蚊器(配合發酵一週至三週的乾草及/或合成產卵費洛蒙)等，所以建立腦炎性節肢病毒病媒蚊監測系統首先要找出適合各種病媒蚊的捕蚊器具。

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 Beatty &

Marquart, 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>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>	<i>Aedes albopictus</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes vexans</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Ochlerotatus dorsalis</i> <i>Ochlerotatus japonicus</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>
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>
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

### (一)病媒蚊採集方法

因為傳播腦炎性節肢病毒的病媒蚊種類很多，習性不同，不同採集方法可能採集到不同種類的蚊蟲。於蚊蟲密度較高季節(5-12月份)，每月1次1個地點，於可能發生腦炎性節肢病毒地點(例如關渡自然公園及木柵動物園)，評估不同採集方法採集蚊蟲的種類及密度。測試的捕蚊器包括孕母捕蚊器(牧草浸泡液、酵母菌發酵液、牧草+酵母菌發酵液及水對照組)、CDC捕蚊燈(加乾冰誘引)、UPdraft捕蚊燈(加乾冰誘引)等。CDC捕蚊燈懸掛高度依據美國疾病管制局的建議約為1.8公尺左右。每天晚上18:00放置捕蚊器及掛燈，第二天早上8:00回收，蚊蟲檢體直接放入乾冰凍死，帶回實驗室使用冷盤(Chilled table)鑑定種類後，以同一地區，至多50隻同種蚊蟲放入離心管後，置於-20或-70冰箱，等待病毒檢驗。

### (二)病媒蚊病毒 RNA 的萃取

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 µl 上清液至新的1.5 ml 微量離心管中，並加入150 µl BA-1 溶液，混和均勻。
5. 吸取560 µl 含有 carrier RNA 的 AVL 溶液至1.5ml 微量離心管中，並加入140 µl 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 µl，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 µl 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，再以
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 ，作為後續病毒檢測用。

### (三)蚊蟲體內帶腦炎性節肢病毒(mosquito-borne arboviral encephalitis)檢驗方法

蚊蟲體內帶腦炎性節肢病毒檢驗方法係參考 Bronzoni 等人 2005 年所發表的 protocol 及本局病媒病毒實驗室的檢驗方法，採用兩階段策略，第一階段是利用雙重反轉錄聚合酶鏈反應 (duplex reverse transcription PCR) 的方法，將病毒 RNA 先以反轉錄的方法產生 cDNA，再以兩對特定針對 Alphavirus 及 flavivirus 的核酸引子同時進行聚合酶鏈反應反應，可分別得出序列片段大小容易分辨的產物，forward cM3W (5'-YAGAGCDTTTTTCGCAWSTRGCHW-3') 及 reverse cM3W (5'-ACATRAANKGNGTNGTCRAANCCDAYCC-3') 這對核酸引子為針對 Alphavirus 非結構蛋白基因的位置，可產生 434bp 片段大小的聚合酶鏈反應產物；而 forward FG1(5'-TCAAGGA ACTCCACACATGAGATGTACT-3') 及 reverse FG2(5'-GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATAACA-3') 這對核酸引子為針對 Flavivirus NS5 基因的位置，可產生 958bp 片段大小的聚合酶鏈反應產物。反應條件是先以 50°C 做 30 分鐘的反轉錄，接著開始聚合酶鏈反應。首先是為 95°C 中 15 分鐘，接著進行 35 個循環的鏈反應，循環條件是 94°C 中 1 分鐘 (denature)，53°C 1 分鐘 (annealing)，72°C 中 2 分鐘 (elongation)，最後在 72°C 中 5 分鐘 (extension)，並以 2% agarose gel 進行電泳，判斷結果，並將有結果的聚合酶鏈反應產物以 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) 回收純化後，送定序。第二階段將第一階段回收純化的聚合酶鏈反應產物以不同的單種病毒核酸引子，再次進行多重聚合酶鏈反應 (multiplex nested PCR, M-N-PCR)，用以鑑定為 Alphavirus 或 Flavivirus 中的何種病毒，反應條件為 94°C 中 1 分鐘 (denature)，53°C 1 分鐘 (annealing)，72°C 中 2 分鐘 (elongation) 進行 25 個循環的鏈反應，最後在 72°C 中 5 分鐘 (extension)，同樣以 2% agarose gel 進行電泳，判斷結果。

(A)



(B)



(C)



圖一、蚊蟲採集器(A)Reiter CDC gravid trap for *Culex* mosquitoes (B)CDC miniature 誘蚊燈(C) updraft (UD) 誘蚊燈。

## 結果

### 一、蚊蟲調查工具及方法比較

以孕母誘蚊器加上牧草、酵母菌及誘蚊燈加乾冰比較蚊蟲誘集效果，發現蚊蟲總數有顯著差異 ( $F_{5,186} = 5.17, P < 0.01$ )，而此差異來自雌蚊數 ( $F_{5,186} = 5.02, P < 0.01$ ) 及雄蚊數 ( $F_{5,186} = 5.42, P < 0.01$ ) (表二)。UD 誘蚊燈加乾冰所誘得之蚊蟲種類及隻數均最多，共 27 種 2,338 隻，CDC 誘蚊燈加乾冰次之 (15 種 319 隻)，接著為孕母誘蚊器加酵母菌 (6 種 225 隻)、孕母誘蚊器加牧草及酵母菌 (10 種 74 隻)、孕母誘蚊器加牧草 (9 種 72 隻) 及孕母誘蚊器加水 (8 種 46 隻)。

表二、95 年 5 月至 11 月蚊蟲調查工具比較結果 (共調查)。

項 目	樣本數	孕母誘蚊器				UD 誘蚊燈+乾冰	CDC 誘蚊燈+乾冰	$F_{5,186}$	$P$
		水	牧草	酵母菌	牧草+酵母菌				
種類數目	32	8	9	6	10	27	15	----	----
雄蚊數	32	3	3	2	1	31	7	5.42	0.00
雌蚊數	32	43	69	223	73	2,307	312	5.02	0.00
總 數	32	46	72	225	74	2,338	319	5.17	0.00

以所誘得的蚊蟲種類分析，UD 誘蚊燈加乾冰誘得三斑家蚊最多，共 2010 隻，佔 86.01%，接著為環紋家蚊 (97 隻，佔 4.15%)、白線斑蚊 (69 隻佔 2.95%)、熱帶家蚊 (39 隻，佔 1.67%)、多斑瘡蚊 (33 隻，佔 1.41%) 等 (表三)。CDC 誘蚊燈加乾冰所誘得的蚊蟲種類以三斑家蚊最多，共 196 隻，佔 61.44%，多斑瘡蚊次之，共 29 隻，佔 9.09%，接著為白線斑蚊 (26 隻，佔 8.15%)、熱帶家蚊及環紋家蚊 (分別採獲 19 隻，佔 5.96%) 等。孕母誘蚊器加牧草、酵母菌及水誘得的蚊蟲種類以三斑家蚊最多 (分別為 27 隻、198 隻及 17 隻，佔 37.5%、88.00% 及 36.96%)、熱帶家蚊次之 (18 隻、17 隻及 8 隻)。

表三、以不同調查工具及誘引劑所採集的蚊蟲種類。

處理	中文	調查次數	陽性次數	雄蚊數	雌蚊數	蚊蟲總數	%
	三斑家蚊	32	19	1	2,009	2,010	85.97
	環紋家蚊	32	11	1	96	97	4.15
	白線斑蚊	32	17	1	68	69	2.95
	熱帶家蚊	32	13	1	38	39	1.67
	多斑瘧蚊	32	6	2	31	33	1.41
	竹生翠蚊	32	8	5	10	15	0.64
	花翅家蚊	32	4	4	7	11	0.47
	灰胸家蚊	32	6	8	1	9	0.38
	中華瘧蚊	32	5	0	7	7	0.30
	白腹叢蚊	32	5	0	6	6	0.26
	白肋斑蚊	32	3	0	6	6	0.26
	芋生叢蚊	32	4	1	4	5	0.21
	側白黃蚊	32	2	0	5	5	0.21
UD 誘蚊燈+	白肋小蚊	32	2	1	3	4	0.17
乾冰	紅胸家蚊	32	2	1	3	4	0.17
	斑腳沼蚊	32	4	0	4	4	0.17
	呂宋妙蚊	32	1	1	1	2	0.09
	台灣黑蚊	32	1	0	2	2	0.09
	雙角家蚊	32	1	0	1	1	0.04
	黃尾家蚊	32	1	0	1	1	0.04
	白頭家蚊	32	1	1	1	2	0.09
	馬氏斑蚊	32	1	0	1	1	0.04
	小形家蚊	32	1	1	0	1	0.04
	蛛形翠蚊	32	1	1	0	1	0.04
	二斑家蚊	32	1	0	1	1	0.04
	短鬚家蚊	32	1	1	0	1	0.04
	日本黃蚊	32	1	0	1	1	0.04
	合 計	32	----	31	2,307	2,338	100.00
CDC 誘蚊燈	三斑家蚊	32	14	1	195	196	61.44
+乾冰	多斑瘧蚊	32	4	0	29	29	9.09
	白線斑蚊	32	9	1	25	26	8.15
	熱帶家蚊	32	11	3	16	19	5.96
	環紋家蚊	32	8	0	19	19	5.96
	竹生翠蚊	32	4	0	8	8	2.51
	灰胸家蚊	32	4	0	4	4	1.25
	雙角家蚊	32	3	0	4	4	1.25
	斑腳沼蚊	32	3	2	2	4	1.25
	花翅家蚊	32	2	0	3	3	0.94
	黃尾家蚊	32	2	0	2	2	0.63
	白肋斑蚊	32	1	0	2	2	0.63
	中華瘧蚊	32	1	0	1	1	0.31
	紅胸家蚊	32	1	0	1	1	0.31

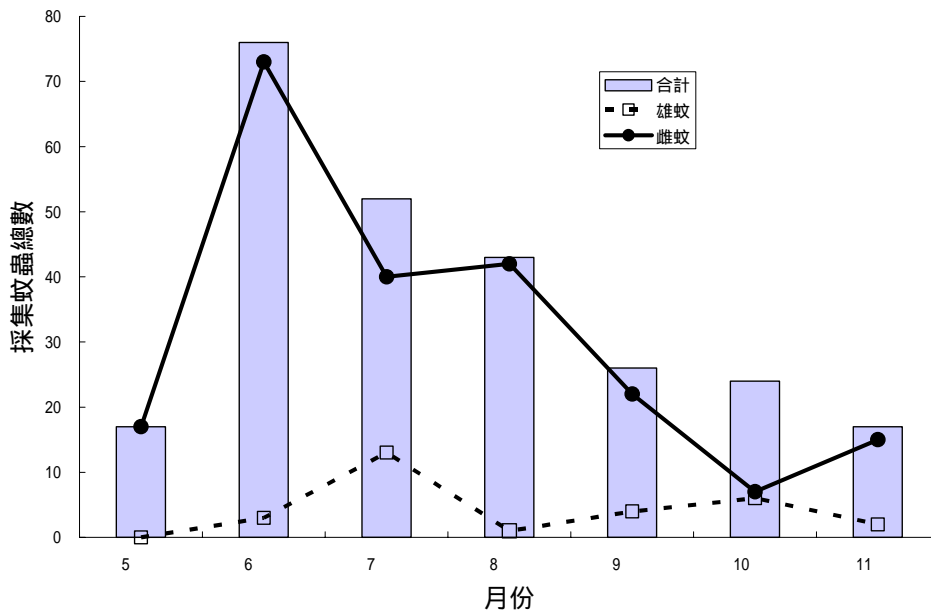
	蛛形翠蚊	32	1	0	1	1	0.31
	合 計	32	----	7	312	319	100.00
孕母幼蚊 器+牧草	三斑家蚊	32	4	1	26	27	37.50
	熱帶家蚊	32	9	1	17	18	25.00
	黃尾家蚊	32	3	0	16	16	22.22
	雙角家蚊	32	2	0	3	3	4.17
	紅胸家蚊	32	2	0	3	3	4.17
	白線斑蚊	32	2	0	2	2	2.78
	多斑瘡蚊	32	1	1	0	1	1.39
	白腹叢蚊	32	1	0	1	1	1.39
	二斑家蚊	32	1	0	1	1	1.39
	合 計	32	----	3	69	72	100.00
孕母誘蚊 器+牧草+ 酵母菌	熱帶家蚊	32	12	1	36	37	50.00
	黃尾家蚊	32	6	0	9	9	12.16
	三斑家蚊	32	3	0	8	8	10.81
	白線斑蚊	32	4	0	6	6	8.11
	雙角家蚊	32	3	0	4	4	5.41
	灰胸家蚊	32	2	0	3	3	4.05
	林氏家蚊	32	1	0	3	3	4.05
	紅胸家蚊	32	1	0	2	2	2.70
	海氏家蚊	32	1	0	1	1	1.35
	斑翅家蚊	32	1	0	1	1	1.35
	合 計	32	----	1	73	74	100.00
孕母幼蚊 器+清水	三斑家蚊	32	5	0	17	17	36.96
	白線斑蚊	32	4	2	6	8	17.39
	熱帶家蚊	32	5	0	8	8	17.39
	黃尾家蚊	32	3	0	5	5	10.87
	雙角家蚊	32	2	0	3	3	6.52
	紅胸家蚊	32	1	0	3	3	6.52
	白腹叢蚊	32	1	0	1	1	2.17
	新小黑蚊	32	1	1	0	1	2.17
	合 計	32	----	3	43	46	100.00
孕母幼蚊 器+酵母菌	三斑家蚊	32	4	0	198	198	88.00
	熱帶家蚊	32	6	2	15	17	7.56
	黃尾家蚊	32	2	0	3	3	1.33
	環紋家蚊	32	2	0	3	3	1.33
	白線斑蚊	32	2	0	2	2	0.89
	雙角家蚊	32	2	0	2	2	0.89
	合 計	32	----	2	223	225	100.00
合 計	32	----	47	3,027	3,074	----	



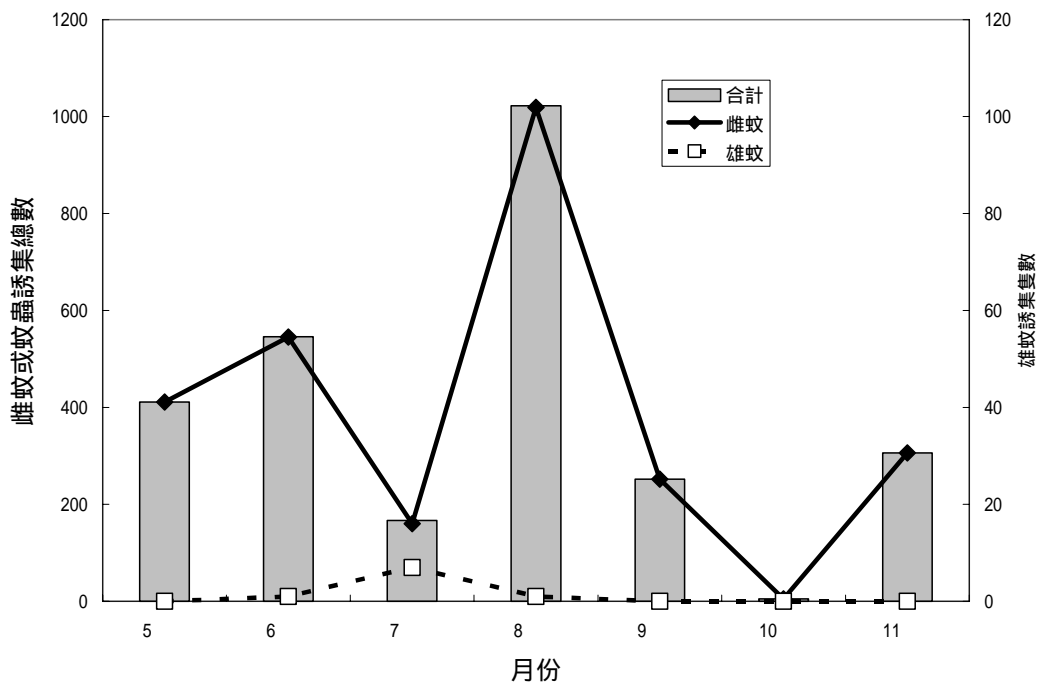
## 二、台北地區蚊蟲密度消長

於民國 95 年 5-11 月在台北市兩個野鳥地點掛燈及放置誘蚊燈誘蚊，調查結果發現文山區蚊蟲密度較低，而北投區密度較高。在文山區所誘得的蚊蟲在 6 月份最多而後逐月遞減，而雄蚊則在 7 月及 10 月份有兩次高峰（圖一 A）。在台北市北投區則在 8 月份誘集到最多的蚊蟲，而雄蚊則於 7 月最多（圖二 B）。

(A)



(B)



圖二、蚊蟲密度消長 (A) 台北市文山區木柵里 (B) 台北市北投區關渡里。

### 三、病媒蚊體內帶病毒檢測結果

截至目前為止，共前往山區村莊、關渡自然公園、木柵動物園、福山植物園等野鳥及候鳥聚集的區域採集，共檢測隻 18,425 蚊蟲池，其中三斑家蚊 14,424 56、環紋家蚊 1134 3、白肋斑蚊 724 102、白線斑蚊 461 59、熱帶家蚊 164 132、白頭家蚊 266 1、鹹水家蚊 206 白線斑蚊、白腹叢蚊 108 42、斑腳沼蚊 143 8、多斑瘧蚊 60 2 及其他蚊種 231 40，結果發現黃病毒屬 4 池陽性 862 池陰性 (表三)，後經電泳跑膠，僅 2 池，經定序比對結果為日本腦炎，每 1000 隻蚊蟲病毒最低檢出率為 0.11%。此二池陽性池數為 95 年 6 月 22 日在台北市北投區沼澤地驅中心點用 UD 誘蚊燈採集的三斑家蚊 50 隻雌蚊及 95 年 9 月 15 日在花蓮縣光復鄉大全村豬舍以 UD 誘蚊燈所採集的三斑家蚊 50 隻雌蚊。檢驗 Alpha 病毒 866 池，結果均為陰性。

表三、95 年野外蚊蟲體內帶病毒檢驗結果。

蚊蟲種類	檢驗池數	檢驗隻數			黃病毒		病毒陽性池數
		雌蚊	雄蚊	總數	陽性數	病毒種類	
三斑家蚊	351	14424	56	14480	2	日本腦炎	0
環紋家蚊	57	1134	3	1137	0		0
白肋斑蚊	30	724	102	826	0		0
白線斑蚊	94	461	59	520	0		0
熱帶家蚊	78	164	132	296	0		0
白頭家蚊	20	266	1	267	0		0
鹹水家蚊	12	206	27	233	0		0
白腹叢蚊	41	108	42	150	0		0
斑腳沼蚊	18	143	8	151	0		0
多斑瘧蚊	10	60	2	62	0		0
帶紋斑蚊	8	57	1	58	0		0
黃尾家蚊	16	33	0	33	0		0
中華瘧蚊	8	29	0	29	0		0
竹生翠蚊	12	18	5	23	0		0
窄翅斑蚊	5	15	6	21	0		0
灰胸家蚊	13	8	9	17	0		0
二斑家蚊	12	15	0	15	0		0
紅胸家蚊	8	13	1	14	0		0
雙角家蚊	11	13	1	14	0		0
黑點家蚊	5	11	2	13	0		0
花翅家蚊	7	11	4	15	0		0
袋蓮荷蚊	2	12	1	13	0		0
馬氏斑蚊	9	10	2	12	0		0
側白黃蚊	6	12	0	12	0		0
安氏斑蚊	4	11	0	11	0		0
呂宋妙蚊	8	8	2	10	0		0
芋生叢蚊	4	4	1	5	0		0
白肋小蚊	2	3	1	4	0		0
小形家蚊	2	0	2	2	0		0

新黑小蚊	2	1	1	2	0	0
蛛形翠蚊	2	1	1	2	0	0
台灣黑蚊	1	2	0	2	0	0
鬚蚊亞屬	1	1	0	1	0	0
高氏黃蚊	1	1	0	1	0	0
海氏家蚊	1	2	0	2	0	0
莫氏家蚊	1	1	0	1	0	0
斑翅家蚊	1	1	0	1	0	0
短鬚家蚊	1	0	1	1	0	0
日本黃蚊	1	1	0	1	0	0
	866	17,970	473	18,425	2	0

以黃病毒群體引子檢測蚊蟲 833 池，其中 Ct 值小於或等於 40 且 Tm 值大於或等於 80 有 4 池（表四），也就是 PCR 檢測結果為陽性，但經過電泳跑膠後，有 3 池有相似產物（958 bp），但基因定序比對結果僅 2 池為日本腦炎。用 alpha 群體引子檢驗 866 池，其中 Ct 值小於或等於 40 且 Tm 值大於或等於 80 有 11 池（表五），但經過電泳跑膠結果產物較小，均明顯小於 434 bp 產物，應為引子的 dimers。

表四、黃病毒群體引子 Real time RT-PCR 檢測值。

項目	蚊蟲檢測樣本			項目	對照組	
	Tm ≥ 80	Tm < 80	合計		Ct	Tm
Ct ≤ 40	4	4	8	陽性	28.94-32.78	80.25-82.40
Ct > 40	72	780	858	陰性	未檢出	65.60-78.80
合計	79	790	866			

表五、alpha 群體引子 Real time RT-PCR 檢測值。

項目	蚊蟲檢測樣本			項目	對照組	
	Tm ≥ 80	Tm < 80	合計		Ct 值	Tm 值
Ct ≤ 40	11	14	25	陽性	30.22-35.50	81.75-83.25
Ct > 40	220	621	841	陰性	未檢出	67.9-79.70
合計	231	635	866			

## 討論

此計畫利用兩個病毒群體引子來檢驗蚊蟲體內帶病毒情況，目前共檢驗 866 池，其中 PCR 黃病毒疑似陽性池數 4 池，而 病毒疑似陽性池數 11 池，但經過電泳跑膠後排除黃病毒疑似陽性池數 1 池及 病毒疑似陽性池數 11 池，最後經基因定序比對確認日本腦炎陽性 2 池。黃病毒的群體引子可有效檢出黃病毒，而 病毒的專一性則有待解決。另外，病毒最低檢出率（MIR）很低，為 0.11%，應將樣本 pool 後，大量篩選，降低成本。

本調查比較調查工具發現 UD 誘蚊燈效果較 CDC 誘蚊燈及孕母誘蚊器佳，且其中 2 池蚊蟲共 50 隻雌蚊檢出日本腦炎。美國疾病管制局建議使用 CDC 誘蚊燈及孕母誘蚊器來誘集傳播西尼羅病毒的病媒蚊種類，例如尖音家蚊、熱帶家蚊等，進行蚊蟲體內帶病毒檢測。本計畫比較 CDC 誘蚊燈及孕母誘蚊器配合酵母菌及牧草等誘引劑，但效果不佳。因為台灣鄉村地區，三斑家蚊為各地區蚊蟲常見種類，而白肋斑蚊則為屏東縣滿洲鄉主要種類，以 UD 誘蚊燈誘引效果好，但對熱帶家蚊白線斑蚊則需要其他調查工具或誘引劑。

## 結論與建議

- 一、可利用群體引子定期進行蚊蟲大量篩選，可瞭解台灣地區病媒種類及其所攜帶的病毒，同時可以監測經蚊蟲傳播新興病毒的入侵。
- 二、台灣野外蚊蟲種類以三斑家蚊為主，可用 UD 誘蚊燈加乾冰誘引，而熱帶家蚊及白線斑蚊則須要進一步研究適合的調查工具或誘引劑。

## 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 for 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.