

一、中文摘要

台灣缺蠓雌蟲對於登革一型、登革二型、登革四型與日本腦炎等四種病毒具有感受性，其中以日本腦炎病毒感受性最佳。在吸食感染後 24 小時即可在雌蠓蟲體偵測大量日本腦炎病毒陽性反應，且感染率達 100%，並持續至感染後 21 天。登革一型病毒在感染後第 10 天在 20% 蟲體測得病毒陽性反應，至第 21 天感染率升至 50%；登革二型病毒在感染後第 14 天在蟲體始測得病毒陽性反應，感染率 20%；登革四型病毒在感染後第 14 天測得 40% 感染率，第 21 天感染率升至 75%。至於登革三型病毒未能驗得病毒陽性反應，顯示台灣缺蠓雌蠓對登革三型病毒具有明顯中腸障壁現象。

關鍵字：台灣缺蠓、登革病毒、日本腦炎病毒、感受性

二、英文摘要

Abstract

This project aims on the vector competence of the biting midge *Forcipomyia taiwana* to dengue 1, dengue 2, dengue 3, dengue 4, and Japanese encephalitis viruses. Susceptible of female *F. taiwana* to various viruses were studied, and massive multiplication of JEV was recorded in female *Forcipomyia taiwana* 24 hr after intrathoracic-injectoin/feeding inoculation, and continued for 21 days with 100 % infection rate. Obvious midgut barrier to dengue 3 virus was also observed in female *F. taiwana*.

Keywords: *Forcipomyia taiwan*, Dengue virus, Japanese encephalitis virus, vector competence

三、前言：

本計畫研究台灣鈹蠓雌蟲對登革病毒、日本腦炎病毒等黃質病毒與屈公熱病毒的感受性，並探討黃質病毒在雌蠓體內的複製情形，同時將針對台灣鈹蠓雌蟲是否傳播黃質病毒做出具體結論。

台灣鈹蠓(*Forcipomyia taiwana* Shiraki)是僅分佈於台灣與中國大陸的吸血昆蟲(虞和劉 1982)，俗稱為小黑蚊、魴微仔、烏微仔等，分類上屬於雙翅目(Diptera)，蠓科(Ceratopogonidae)鈹蠓屬(*Forcipomyia*)，蠓蠓亞屬(*Lasiohelea*)(Lien, 1989, 1991)。台灣鈹蠓發生範圍幾乎遍及全台各縣市，成蟲於日間活動，雌蟲嗜吸人血，被叮後造成皮膚紅腫使人奇癢難耐，嚴重者甚至會產生過敏反應，是一種令人生厭的騷擾性昆蟲(nuisance)，也是台灣特有的，且目前危害最嚴重的吸血昆蟲。

由於台灣鈹蠓早期危害不嚴重，因此自 1913 年 Shiraki 發現並命名(Sun, 1967)後少有研究，且多數為調查記錄(張 1951；虞和劉 1982)，形態描述(Chen et al., 1979；裘和榮, 1979；陳等, 1980)，生態、生活史觀察(柳等, 1964；虞和劉, 1982；王和葉, 1997；Chuang et al., 2000；謝, 2007)，飼育技術(Sun et al. 1971；裘和榮, 1979；劉, 2010)，以及防治(陳 1987；謝, 2007)等。至於台灣鈹蠓是否為病媒昆蟲則沒有具體報告，Chiao and Wu (1959)曾報導自台灣鈹蠓蟲體分離出日本腦炎病毒，吳等(2008)則在台中的調查中以 PCR 檢測出雌蟲蟲體有 B 型肝炎病毒的陽性反應。這是目前已知僅有的兩篇報告，指出台灣鈹蠓可能攜帶病毒性病原體，惟均未進一步證實台灣鈹蠓是否是病媒昆蟲。

依近年的危害嚴重程度研判，台灣鈹蠓可能不是病媒昆蟲，因為合理推論如果台灣鈹蠓為特定疾病之病媒昆蟲，則以其近年猖獗情形，應該早就將該疾病傳播開來。然由於早期台灣鈹蠓僅在山邊村落零星發生，人口稠密度不高，加上可能沒有病原存在，因此無法證實其是否具有攜帶或傳播特定病原之可能性。惟近年許多新興傳染病的發生，並藉由交通運輸的便利，經由商務、旅遊、工作等因素，將病原傳播至各地，也有可能藉由交通工具將攜帶有病原的其他病媒傳入進一步傳染給本地其他吸血昆蟲造成流行。因此有必要針對台灣鈹蠓對流行於台灣地區的病原進行感受性研究，以正確掌握潛在病媒的具體資訊。

蠓科昆蟲多數偏好吸食動物血液，因此許多成員都為動物疾病之重要病媒(余, 2001；Guercio et al., 2010)，僅有極少數種類會傳播人類絲蟲病 Mansonelliasis (Agbolade et al., 2006)。台灣鈹蠓危害日益嚴重，若其具有傳播病毒能力，將對民眾健

康造成極大威脅，因此有必要探討其雌蟲是否具有傳播病毒性疾病之能力與可能性。二次大戰後新興傳染病主要為登革熱，近年則有屈公熱；台灣南部地區近年飽受登革熱威脅，尤其今年至今已有 3 例死亡病例，疫情可說相當嚴峻。加上近年亦有零星境外移入的屈公熱病例，亦為台灣防疫工作增添風險。此外，日本腦炎一直是台灣本土性流行病，雖然自 1968 年的疫苗政策實施，絕大多數人都得以受到保護，可是每年仍有數十病例發生(CDC, 2010)；所以如果台灣缺蠓雌蟲會傳播日本腦炎病毒，則可能增加疫情的嚴重性。因此本計畫擬探討台灣缺蠓雌蟲對這些種病毒的感受性，以及這些受測病毒是否可以在蠓體內進行複製，並具有傳播能力。

四、材料與方法

1. 供試蟲源

本計畫所使用的實驗昆蟲為台中市大坑地區所採集的台灣缺蠓雌成蟲，採集時誘集者小腿必須穿著絲襪避免雌成蟲吸食誘集者的血液。將雌成蟲帶回實驗室中置於直徑 5 cm×高 10 cm 紙杯內，於紙杯內放入適量棉花以維持成蟲活動空間濕度再於杯口罩上一層紗網，紗網上方擺放含 5%糖水棉花提供雌蟲吸食。飼養環境維持 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 70-80%，光照:黑暗 L14:D10 小時。

2. 供試登革病毒

採用原型(prototype)登革二型病毒新幾內亞株(dengue 2 virus, New Guinea C strain)，該株病毒係 1993 年自成功大學醫學院寄生蟲科引進本實驗室。引進病毒原培養於 *Aedes pseudoscutellaris* (Theobald) 蚊子細胞株 AP-61 中 (Varma *et al.* 1974)，引進本實驗室後改以白線斑蚊成蚊生體培養以及 C6/36 細胞株培養。其他病毒株自國防醫學院引進，分別為 DENV-1 (Myanmar 38862/01)，DENV-3(98TW503)，DENV-4 (H241) 等各型登革病毒及 genotype III JEV 為 2004 年自長庚大學公衛暨寄生蟲學科陳維鈞教授實驗室引進之 T1P1 strain，均培養於 C6/36 細胞株。C6/36 細胞培養乃將感染病毒 3-4 天且呈現細胞病變(CPE)之細胞收下，以低速離心去除細胞及碎片後，以 0.45 μl 濾膜過濾成病毒液(virus stock)，病毒液利用 BHK 細胞進行力價測試；並冷凍保存於 -70°C 中備用。本次試驗各受測病毒株之力價分別為登革一型(2.79×10^6 PFU/ml)、二型(3.14×10^5 PFU/ml)、三型(2.15×10^5 PFU/ml)及四型病毒(2.97×10^5 PFU/ml)、日本腦炎病毒(1.69×10^8 PFU/ml)。

3. 胸部注射接種法

以蟲體胸部注射法為主要病毒接種方式，修改 Rosen and Gubler (1974) 在蚊體之胸部注射接種法(intrathoracic inoculation)，將採集的台灣缺蠓雌成蟲，先以 CO_2 進行麻醉，再於解剖顯微鏡下利用具刻度之自製玻璃毛細管微針(Drummond Scientific Co., USA)，

將病毒由雌蠓胸部側板注入蚊體，每次注射量約為 0.03 μ l，對照組則注射細胞培養液。接種後之雌蠓置於紙杯內飼以 5%糖水，並置於 25 \pm 0.5 $^{\circ}$ C、相對濕度 75 \pm 5%，光照 L:D=14:10 之昆蟲生長箱中飼育。在注射後第 1、2、3、4、7、10、14 及 21 天，將雌蠓各 10 隻取出以碎冰低溫麻醉後，檢測蠓體病毒。

4.人工薄膜給食感染法

將健康自願者提供的血液，經離心去除含血清之上清液，再加入等比例緩衝液還原至原體積。吸食感染時將供試病毒與清洗過的紅血球以 1:1 的比例混合均勻再加入至人工膜上供雌蠓吸食，並飼養在 25 $^{\circ}$ C、相對濕度 75 \pm 5%，光照 L:D=14:10 之昆蟲生長箱中飼育。並依試驗需求在吸食病毒後後第 1、2、3、4、7、10、14 及 21 天，將雌蠓取出以碎冰低溫麻醉後，以每五隻一池方式檢測雌蠓體病毒。

5.反轉錄聚合酶鏈鎖反應(Reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR)

RNA 之製備

將雌蠓置於內含有 10%FBS 及 RPMI-1640 的培養基冰浴進行研磨，將均質液高速離心 12000g, 10 分鐘，取其上清液過 0.2 μ m 過濾膜注入 1.5ml 微量離心管備用。依 Viral RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA) 操作說明進行 RNA 之製備，取 150 μ l 之均質液置於 2ml 微量離心管中加入 570 μ l RXV Buffer 混合均勻後，靜置室溫反應 10 分鐘。加入 570 μ l 酒精(98-100%) 混合均勻後，取 650 μ l 移入 spin column 中，並將 spin column 放置於 collection tube 上，6000g 離心 1 分鐘去除濾液，重複一次。再取 500 μ l WS Buffer 10000g 離心 1 分鐘，清洗兩次，再於高速離心 10000g, 3 分鐘，去除殘留 WS Buffer。再將 spin column 移入 RNase-free 1.5ml Elution tube 內，加入 50 μ l 預熱 80 $^{\circ}$ C 之 RNase-free 無菌水，10000g 離心 1 分鐘，將萃取出之 RNA 保存於-70 $^{\circ}$ C。

6. 聚合酶連鎖反應

利用 Molecular Biology Tools 之操作說明書進行反應操作，將 RNA 反轉錄合成 cDNA 並進行聚合酶連鎖反應。於 0.2 ml 微量離心管中分別加入各 1 μ l 專一性引子組，5x Reation Mix 10 μ l, 5x Enhancer 10 μ l, 1 μ l 反應酵素及 10 μ l RNA，最後加入 DEPC 處理之無菌水使總體積到達 50 μ l，反應條件設定於下：第一階段：50 $^{\circ}$ C 30 分鐘、95 $^{\circ}$ C 5 分鐘；第二階段：95 $^{\circ}$ C 30 秒、42 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 35 反應週期；第三階段：72 $^{\circ}$ C 10 分鐘；存於 4 $^{\circ}$ C。

7.RT-PCR 檢測雌蠓體中黃病毒技術

PCR 反應引子(primer)之製備:

- A、登革病毒專一性引子(dengue specific primer)之合成：依據 Henchal et al.(1991)設計，合成具登革病毒專一性之 universal dengue virus-specific 之負股 primer AD3(-)(CTGATTTCCATACCGTA)及正股 primer

AD4+)(GATATGGGCT-ATTGGATAGA)(PCR mate 391 DNA Synthesizer, Applied Biosystems, USA)。

- B、登革血清型專一性引子(dengue serotype specific primer)之合成：另依據 Morita *et al.* (1994)合成具登革一、二、三、四型病毒專一性且能區辨四種血清型之四組，共八條引子，其核酸序列分別為登革一型 D1S (GGACT-GCGTATGGAGTTTTG; 2229-2248)，D1C (ATGGGTTGTGGCCTAATCAT; 2718-2699)、登革二型 D2S (GTT-CCTCTGCAAACACTCCA; 1203-1222)，D2C (GTGRRATTTTGAT-TTCCTTG; 1432-1413)、登革三型 D3S (GTGCTTACACAGCCCTA-TTT; 2253-2272)，D3C (TCCATTCTCCCAAGCGCCTG; 2572-2553)、登革四型 D4S (CCATTATGGCTGTGTTGTTT; 3973-3992)，D4C (CTTCATCCTGC-TTCACTTCT; 4370-4351)。
- C、日本腦炎病毒 PCR 反應引子(primer)之製備：依分離自三斑家蚊蚊體之 JEV 序列，設計 JEV 專一性引子對(5'ACATCAGGYCACCTRAAAT3'; 5'CCCATTARYCCTTGTGTGAT3'；1819-1837; 2353-2372)。
- D、參考 Parida *et al.* (2007)設計屈公熱病毒 E1 區域引子對，正股:ACGCAATGAGCG-AAGCGC(10294-10312)，反股 CTGAAGACATTGGCCCCAC (10498-10480)。

8. DNA 電泳分析

將瓊脂 (agarose) 加熱溶於 0.5X TBE 溶液中，配置成 1.5% 的電泳膠體，待冷卻至 60-65°C 後，倒入膠片盤中，待膠體完全凝固後，置於電泳槽中，注入 0.5X TBE 溶液。取 PCR 產物 5 μ l 與 2 μ l 的 6X DNA loading dye 混合均勻後，注入瓊脂膠體樣本槽中，以 100 伏特電壓進行電泳分析，泳動 25 分鐘後，置於溴化乙錠(ethidium bromide) 溶液(1 μ g/ml)中染色 1 分鐘，以去離子水退染 30 分鐘，置於紫外燈觀察箱中觀察並照相記錄。

9. 台灣缺蠓雌蟲對日本腦炎病毒與各型登革病毒感受性試驗

以人工給食法令台灣缺蠓雌蟲吸食上述登革病毒與日本腦炎病毒，並在吸食後 1、2、3、4、7、10、14 天，各取 10 隻雌蟲，利用 RT-PCR 以單隻方式檢測病毒陽性率。

10. 田間台灣缺蠓雌蟲攜帶病毒檢測

於 7 月至 9 月間在小黑蚊危害嚴重地區之一的台中市大坑地區採集台灣缺蠓雌蟲，採集食以人小腿誘集方式進行，同時讓採集者穿上網襪後再覆以絲襪，確保雌蟲不會吸食到採集者的血液。將誘集蟲體攜回實驗室後鑑定無誤後，利用 RT-PCR 配合各型登革病毒、日本腦炎病毒、屈公熱病毒等專一性引子，以單隻方式檢測田間小黑蚊攜帶病毒情形。

五、結果與討論

利用注射感染法將登革一型、登革二型、登革三型、登革四型、與日本腦炎等五種病毒注入台灣鈹蠟雌蟲體內，結果顯示台灣鈹蠟雌蟲蟲體組織可提供這五種病毒進行複製作用。

圖一顯示注射登革一型病毒之後於 24、48 小時可測得微量病毒，72 小時後病毒量隨時間增長呈現逐漸增加趨勢；感染後第七天由電泳條帶顯示鈹蠟雌蟲體中含大量病毒，且感染後第 10、14 天雌蠟蟲體亦維持高量病毒情形，至第 21 天病毒濃度有下降趨勢。此結果顯示台灣鈹蠟雌蟲蟲體組織可以提供為登革一型病毒複製的場所。登革二型病毒亦自注射後第二天起即可偵測得病毒，注射後第三天病毒呈現微幅上揚趨勢，然第 4 添置 21 天則無明顯變化(圖二)。至於登革三型病毒則僅分別在第 7 天測出微量病毒，第 10 天稍微增加，第 14 天檢測得相對較多量病毒，而第 21 天則均無病毒被驗出(圖三)。至於何以可分別在第 7、10、14 天檢測得少量病毒，然未能在往後的時間檢測得病毒，原因有待進一步探討；不過此結果也顯示此血清型病毒可能不易在鈹蠟雌蟲蟲體組織複製。登革四型病毒注射感染雌蟲後第三天才病毒被檢測出，之後蟲體含少量病毒，至第 14 天病毒量方有較明顯的增加量，並持續至 21 天(圖四)。比較台灣鈹蠟雌蟲以注射感染各型登革病毒之結果，結果顯示台灣鈹蠟雌蟲蟲體對登革三型病毒感受性最差，而以登革一型最佳，其次為登革二型與登革四型。本注射試驗總計進行兩次，兩次試驗中日本腦炎病毒與登革一型、四型病毒呈現完全相同之病毒增殖模式；登革三型有一次在第三天偵測得病毒陽性反應，另一次第二天即有陽性反應；至於差異性較大的為登革二型病毒，有一次只有 7、14 天可測得病毒反應，另一次則自注射後 24 小時即可偵測得陽性反應(表一)。

在五種注射感染法的受測病毒中以日本腦炎病毒複製增幅最為明顯(表二、圖五)，病毒注射後 24 小時即可偵測大量病毒複製，其後在所有檢測時間均可在蟲體驗得大量病毒，說明台灣鈹蠟雌蟲蟲體組織非常適合提供日本腦炎病毒複製。登革二型病毒兩次試驗呈現較大差異可能為供試蟲體的差異或是操作過程的問題。

綜合比較各病毒的注射感染與吸食感染情形，以日本腦炎病毒對台灣鈹蠟的感染性最高，無論注射或吸食方式感染，均在感染後 24 小時即可測得高量病毒陽性反應，且高量病毒感染現象持續至 21 天。在各型登革病毒在注射途徑與吸食感染途徑的感受性結果相似，均以登革一型病毒感受性最佳，其次為二型、四型病毒，最差為登革三型。

這個結果指出台灣缺蠓對於不同血清型登革病毒的感受性具有明顯差異性，其原因為何則有待進一步探討。不過本試驗呈現台灣缺蠓雌蟲對日本腦炎病毒感受性最高，也有可能是受力價的影響，在五種受測病毒中以日本腦炎病毒的力價最高(1.69×10^8 PFU/ml)，登革一型病毒的 2.79×10^6 PFU/ml 次之，其餘三個病毒株均為 10^5 PFU/ml。本試驗為首次嘗試探討台灣缺蠓對日本腦炎病毒以及各登革病毒具有感受性，目的在瞭解台灣缺蠓是否可以感染上這些黃質病毒，因此均以未稀釋之病毒液進行測試，而在瞭解台灣缺蠓對這些病毒具有感受性之後本實驗室將進一步針對台灣缺蠓在不同力價條件下對於日本腦炎病毒感受性進行精確探討。

進一步探討台灣缺蠓對日本腦炎病毒與登革病毒的感受率，令雌蠓吸食感染後在不同天數，利用 RT-PCR 檢測單隻蚊體的病毒陽性率，結果顯示在吸食感染後 24 小時即可在雌蠓蟲體偵測大量日本腦炎病毒陽性反應，且感染率達 100%，並持續至感染後 21 天。登革一型病毒在感染後第 10 天在 20% 蟲體測得病毒陽性反應，至第 21 天感染率升至 50%；登革二型病毒在感染後第 14 天在蟲體始測得病毒反應，感染率 20%；登革四型病毒在感染後第 14 天測得 40% 感染率，第 21 天感染率升至 75%。至於登革三型病毒未能彥得病毒反應，顯示台灣缺蠓雌蠓對登革三型病毒具有明顯中腸障壁現象(表六)。雌蟲在吸食病毒血症期的血液時有所謂「腸道障壁」(gut barrier)的現象，本試驗顯示受測的五種病毒，只要沒有腸道障壁現象，或可以越過腸道障壁，有機會進入雌蠓血體腔，則蟲體組織可以提供病毒複製的場所，此結果說明台灣缺蠓可能有具有病媒昆蟲的潛力。

利用人工給食法令台灣缺蠓雌蟲吸食各型登革病毒與日本腦炎病毒，並在吸食後 1、2、3、4、7、10、14、21 天收集蟲體並檢測蠓體內之病毒增殖情形。表三顯示吸食感染日本腦炎病毒後 24 小時即可偵測到強烈的病毒陽性反應訊號，且持續至第 21 天(圖六)。至於在吸食登革病毒感染組則顯示台灣缺蠓雌蟲對不同血清型病毒感受性不同(圖七至圖十)；在各吸食組的前四天，並未檢測出任何病毒陽性反應，其中登革一型病毒可在第七天被檢測出病毒陽性反應，並持續至二十一天。而登革二、四型病毒則在第十天可測得病毒陽性反應並持續到二十一天。至於登革三型病毒，則均未能檢測到蟲體有病毒增殖的反應。比較台灣缺蠓雌蟲對各血清型登革病毒感受性，結果顯示登革一型病毒具有較好的感染性，登革二、四型的感染性次之，而登革三型則不具雌蠓感染性。比較注射感染與吸食感染途徑之病毒增殖結果，顯示台灣缺蠓雌蟲對登革三型病毒具有中腸障

壁現象。病媒蚊對不同病毒株可能具有不同感受性(Rosen et al., 1985)，此差異可能決定於遺傳因子(Tardieux et al. 1991; Failloux et al. 1995)，其次，病媒蚊障壁(barrier)的存在與否，也影響登革病毒的傳播。病毒隨患者血液進入病媒蚊中腸，首先會感染中腸細胞，並在中腸腸壁細胞複製或穿透中腸腸壁進入血腔，之後再隨血液循環送至全身感染其它組織，如唾腺細胞、腦神經細胞及生殖系統等。此時若該組織對病毒不具感受性，或者具病毒感受性，且病毒得以在該組織複製，惟複製之病毒無法釋出。這種現象即稱為病媒蚊障壁，影響病毒傳播的有中腸障壁(gut barrier)、唾腺障壁(salivary gland barrier)等。Mercado-curriel et al.(2008)指出病媒蚊對病毒的中腸障壁可能是與蚊體消化道上受子(receptor)的影響。目前尚未有台灣缺蚊與病毒之間相關性的報告，因此其對病毒間感受性差異尚未有人探討，本試驗結果具參考價值。

本年度計畫同時於八月至九月間，在小黑蚊危害嚴重地區之一的台中市大坑地區誘捕田間雌蚊，攜回實驗室後分別以 RT-PCR 檢測蟲體是否帶有登革病毒、日本腦炎病毒以及屈公熱病毒，結果受測的三批次，總計 90 隻蟲體均呈病毒陰性反應。

蚊科庫蚊屬(*Culicoides*)的許多成員會傳播動物與人類的疾病，如雞的住血原蟲性白冠病(Leucocytozoonosis)、人的線蟲病，以及許多動物的病毒性疾病；目前從庫蚊體內分離出來的病毒已經超過 50 種，包括：牛流行熱 (bovine ephemeral fever)、藍舌症 (bluetongue) 與非洲馬疫病 (African horse sickness)等嚴重的動物疾病病毒(余 2001)。日本地區在 1985 ~ 2002 年間從田間 456,300 隻庫蚊中分離出 6 種不同種類動物病毒(Yanase et al., 2005)。至於親源關係相近的缺蚊屬(*Forcipomyia*)昆蟲，則少有疾病傳播報告；Ottley et al. (1983)指出 *Forcipomyia (Lasiohelea) townsvillensis* 可能是動物絲蟲病(Equine onchocerciasis)之潛在病媒。Dougall et al. (2011)則證實澳洲缺蚊屬、蟻蚊亞屬(*Lasiohelea*)的昆蟲具有傳播利什曼原蟲(*Leishmania*)的能力，顯示其為該原蟲病的潛在病媒昆蟲。

由於台灣缺蚊僅分布於台灣與中國大陸，且目前只有在台灣造成猖獗危害，因此目前除了騷擾性為害的觀察報告之外，並未有疾病傳播相關研究。雖然吳等(2008)曾在台中市的田間調查中於台灣缺蚊雌蟲體檢測得 B 型肝炎病毒的陽性反應；Chiao and Wu (1959)亦曾報導福建地區採集台灣缺蚊雌蟲體驗出日本腦炎病毒反應，可是均未有進一步探討。本試驗是第一個證實台灣缺蚊雌蟲對日本腦炎病毒以及登革一、二、四等三個血清型病毒具有感受性，其中又以日本腦炎病毒對台灣缺蚊感染力最高。吸血昆蟲對病毒性病原具有感受性，即代表其具有病媒能力，這個試驗結果指出，台灣缺蚊具有潛在

病媒的可能性；尤其登革熱與日本腦炎均為台灣每年都有感染病例的法定傳染病。惟是否台灣缺蠓真的是病媒昆蟲，仍需進一步探討其傳毒能力與田間蟲體攜帶病毒的流行病學研究。至於登革三型病毒經由注射感染，可以在感染後第 10 天驗得病毒陽性反應，然經由吸食途徑卻未能感染上病毒，因此初步判斷可能是中腸障壁現象。而台灣缺蠓對於登革三型病毒是否真的具有中腸障壁現象，又何以對其他血清型登革病毒具有感受性？具有學術研究價值，應該一步探討釐清。

吸血性昆蟲要成為真正的病媒昆蟲除了對病原要具有 5% 以上感受性的病媒致病力 (vector competence) 外，仍需要具備病媒能力 (vectorial capacity)，如對宿主或貯備宿主的吸血偏好、是否容易吸食到宿主血液、族群密度、繁殖力、壽命、與適應環境因子、氣候條件等。台灣缺蠓從台南市關廟、歸仁、新化區以北，至新竹縣以南區域為主要為害地區(杜，全台小黑蚊發生普查、未發表)，而這些地區並非登革熱主要流行區；況且小黑蚊以鄰近山邊的村落環境為主要危害區，而登革熱好發於都會區環境；加上台灣缺蠓對登革病毒的感受性不高，病毒血症期患者不致到戶外被小黑蚊叮等因素，台灣缺蠓成為登革熱病媒昆蟲的機率應該不高。

至於分析台灣缺蠓是否為病毒感受性較高的日本腦炎病媒？由於台灣缺蠓高度嗜吸人血，因此有小黑蚊危害的地方都是以人群活動的社區、學校、遊樂區、風景區為主，畜牧場或動物畜舍周邊並非小黑蚊發生處，且尚未有養豬場遭受小黑蚊危害的報導；加上日本腦炎疫苗政策的落實，小黑蚊即使容易吸到人血也不會獲得病毒，因此台灣缺蠓要成為日本腦炎病媒昆蟲的機會或許不大。然而，因為台灣缺蠓的嗜吸人血特性，使得過往的觀察與研究都侷限於以人活動為主的社區環境，不過在近年的田野調查經驗得知，小黑蚊除嗜吸人血外，亦可吸食豬隻血液，曾觀察到雌蠓貼在豬的耳朵、肚皮上吸食，而豬恰又是日本腦炎病毒的最佳增幅宿主。因此研究台灣缺蠓傳播日本腦炎病毒機制，與探討養豬場環境的小黑蚊發生、有無病毒攜帶情形等，有助釐清小黑蚊是否可能是日本腦炎病媒昆蟲。

六、結論與建議

本計畫試驗結果證實台灣缺蠓(小黑蚊)雌蟲對日本腦炎病毒、登革一型、二型、四型病毒具有程度不等之感受性，其中以日本腦炎病毒最易感染。小黑蚊是台灣新興起的環境害蟲，依近年的密度調查數據與民眾陳情內容顯示，小黑蚊在台灣可能仍以“蔓延”

的態勢增加危害範圍與層面，因此雖然目前未證實其是否具有攜帶或傳播特定病原的情形，惟未來難保小黑蚊不會蔓延至病毒傳染病流行區，或是特定病原藉由人為活動或攜帶有病原的其他病媒昆蟲藉由交通工具傳入小黑蚊高好發區，導致讓小黑蚊有傳播病毒的可能性。雌蠓對日本腦炎病毒具高感受性的特性，使得其潛在病媒的風險仍未能排除。在沒有更充份的證據下，目前不宜對台灣缺蠓是否為病媒昆蟲驟下定論，而應繼續進行相關研究。

七、計畫重要研究結果及具體建議

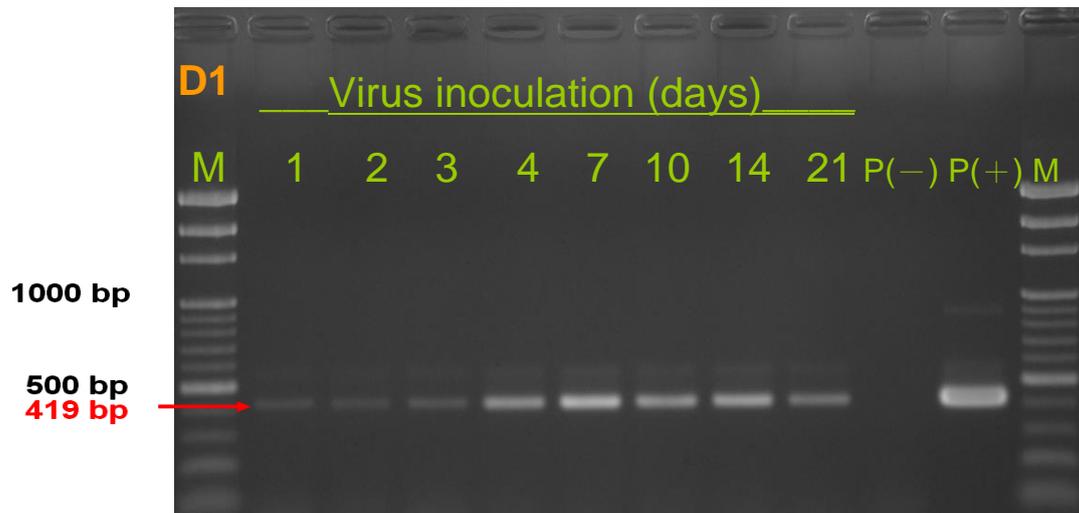
本計畫首次證實台灣缺蠓雌蟲對日本腦炎與登革病毒具有感受性。建議針對台灣缺蠓是否傳播黃質病毒，以及針對田間台灣缺蠓是否攜帶黃質病毒進行監測調查。將來應依研究結果界定台灣缺蠓是否為病媒昆蟲，或是為潛在病媒昆蟲；並進行其傳播疾病的風險評估，以及研擬因應對策。

八、參考文獻

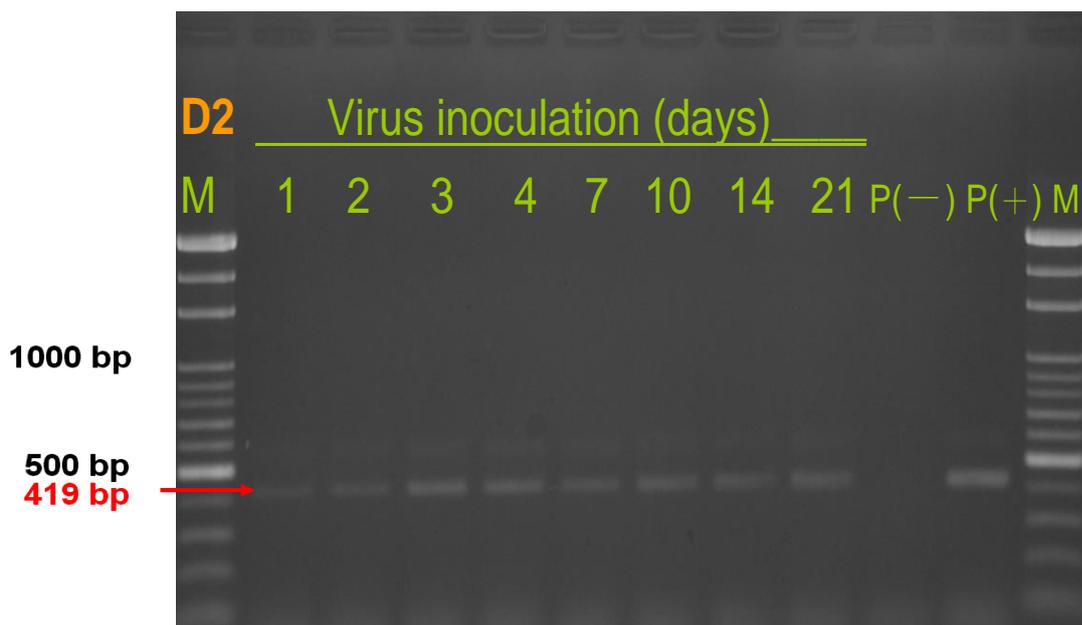
- 余章游。2001。荒川庫蠓族群消長與餵血因子影響。國立中興大學獸醫學系博士論文。139 頁。
- 吳正男、羅偉誠、林春福、李憲明。2008。台灣鈹蠓攜帶病原體潛在性與吸血源研究。台灣昆蟲特刊。11:37-42。
- 陳錦生。1987。花蓮地區台灣鈹蠓(小黑蚊)幼蟲防治試驗。14 頁。行政院環境保護署。
- 陳錦生、連日清、徐世傑。1980。台灣鈹蠓之形態及掃描電子顯微鏡觀察(雙翅目:蠓科)。國立中興大學昆蟲學報 15:211-226。
- 張本華。1951。四川省三種吸血蠓蠓(墨蚊)的分類研究。中國昆蟲學報 1(3):280-285。
- 虞以新、劉康南。1982。中國蠓蠓的研究。科學出版社。北京。84 頁。虞以新、劉康南。
- 1982。中國蠓蠓的研究。科學出版社。北京。84 頁。
- 裘明華、榮雲龍。1980。台灣鈹蠓幼期的形態(雙翅目:蠓科)。中國昆蟲學報 23(1):66-75。
- 裘明華、榮雲龍。1979。台灣鈹蠓的生活史研究(雙翅目:蠓科)。中國昆蟲學報 22(4):437-442。
- 劉文勇。2010。臺灣鈹蠓(雙翅目:蠓科)之飼育技術、吸血習性及其誘集器開發。國立中興大學昆蟲學系博士論文。152 頁。
- 謝伯岳。2007。台灣鈹蠓 *Forcipomyia taiwana* (Shiraki) 的產卵習性、棲群動態與對昆蟲生長調節劑感受性之研究。國立中興大學昆蟲學系研究所碩士論文。83 頁。
- CDC. 2010. <http://nidss.cdc.gov.tw/SingleDisease.aspx?Pt=s&dc=1&dt=3&disease=0620>
- Chen WJ, Wei HL, Hsu EL, Chen ER: Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 viurs on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *J Med Entomol* 1993;30:524-530.
- Chiao YU, Wu SY: Successful isolation of the encephalitis type B virus from *Lasiohelea taiwana* (blood-sucking fly). Its significance in relation to the epidemiology. *Prensa Med Argent* 1959;46:1774-8.
- Chuang YY, Lin CS, Wang CH, Yeh CC: Distribution and seasonal occurrence of *Forcipomyia taiwana* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Nantou area in Taiwan. *J Med Entomol* 2000;37:205-209.
- Guercio A, Di Marco P, Manno C, Di Bella C, Purpari G, Torina A: Ovine Catarrhal fever (Bluetongue): Analysis of *Culicoides* species in seropositive farms. *Transbound Emerg Dis* 2010;57:15-18.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF: Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol* 2011;41:571-579.
- Ho M: Current outlook of infectious diseases in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 1998;31:73-83.
- Leake CJ: The vector competence of colonized *Aedes katherinensis* for dengue-2 virus. *Trans*

- Roy Soc Trop Med Hyg 1984;78:829-832.
- Lien JC: Taxonomic and ecological studies on the biting midges of the subgenus *Lasiohelea*, genus *Forcipomyia* from Taiwan. *J Taiwan Mus* 1989;42:37-77.
- Lien JC: Seven new species and four new record of *Forcipomyia* subgenus *Lasiohelea* from Taiwan (Diptera : Ceratopogonidae). *J Taiwan Mus* 1991;44:83-116.
- Mercado-Curiel RF, Black IV WC, Munoz ML: A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology* 2008;8:118
doi:10.1186/1471-2180-8-118 (15 pages)
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N: Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250-254.
- Okuno T, Mitchell CJ, Chen PS, Hsu S, Ryu E: Experimental transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex tritaeniorhynchus* and *C. fuscocephalus*. *Ann Trop Med Parasito.* 1975;69:203-206.
- Agbolade OM, Akinboye DO, Olateju TM, Ayanbiyi OA, Kuloyo OO, Fenuga OO: Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. *Korean J Parasitol* 2006;44:67-72.
- Ottley ML, Dallemagne C, Moorhouse DE: Equine onchocerciasis in Queensland and the Northern Territory of Australia. *Aust Vet J* 1983;60:200-203.
- Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Pradeep Babu J, Lakshmana Rao PV, Morita K: Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:351-357.
- Rosen L, Gubler DJ: The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23:1153-1160.
- Sun WKC: Study of a biting midge, *Forcipomyia (Lasiohelea) taiwana* (Shiraki) (Diptera : Ceratopogonidae). I. Description of the complete life cycle of the midge reared in the laboratory. *Bio. Bull Tunghai Univ Taiwan, Taichung.* 1967;29:1-10.
- Weng MH, Jih CL, Chang CL, Chen WY: Vector competence of *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) from Taiwan for a sympatric strain of Japanese encephalitis virus. *J Med Entomol* 2000;37:780-783.
- Weng MH, Jin CL, Yu MW, Hsieh LW, Chuan C: Susceptibility of three laboratory strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Japanese encephalitis virus from Taiwan. *J Med Entomol* 1997;34:745-747.
- Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M., Miura Y, Tsuda T: Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985-2002. *J Med Entomol* :2005;41:63-67.

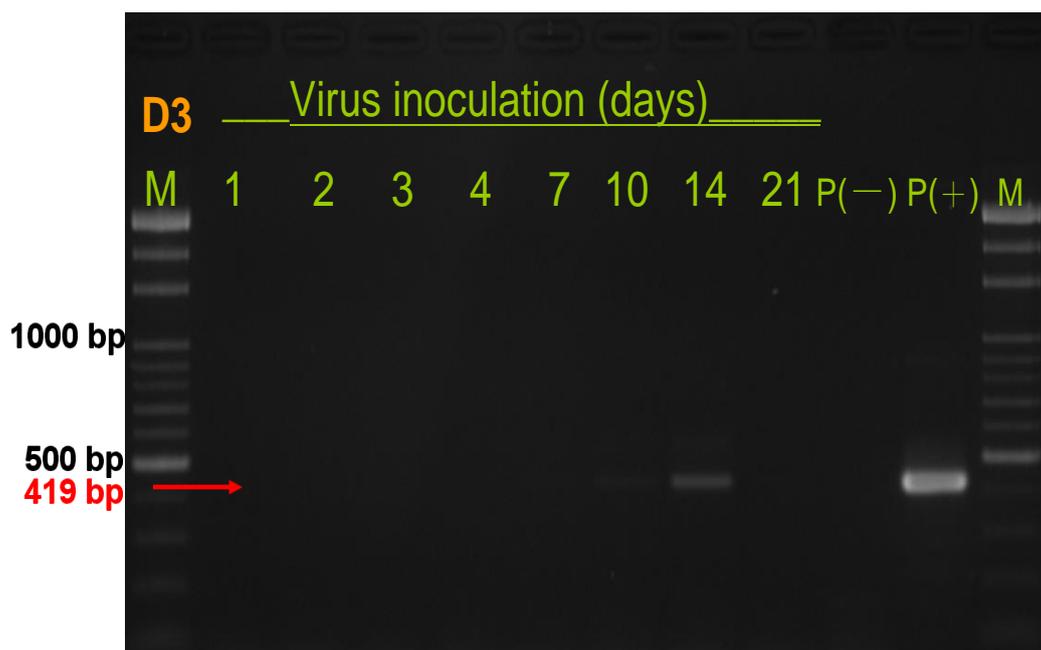
八、圖、表



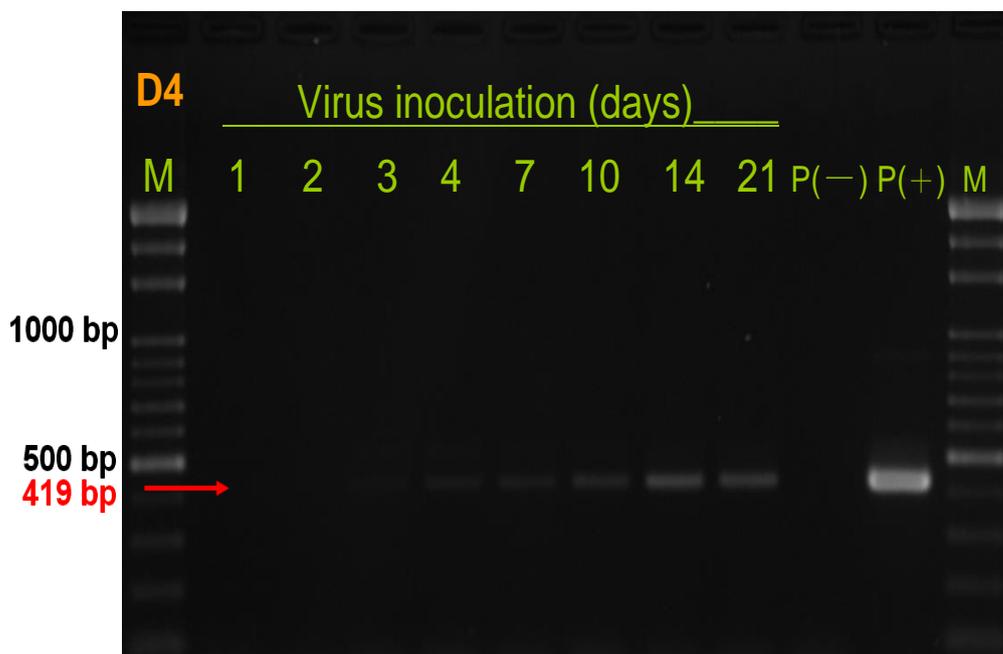
圖一、台灣缺蠟雌蟲注射登革一型病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



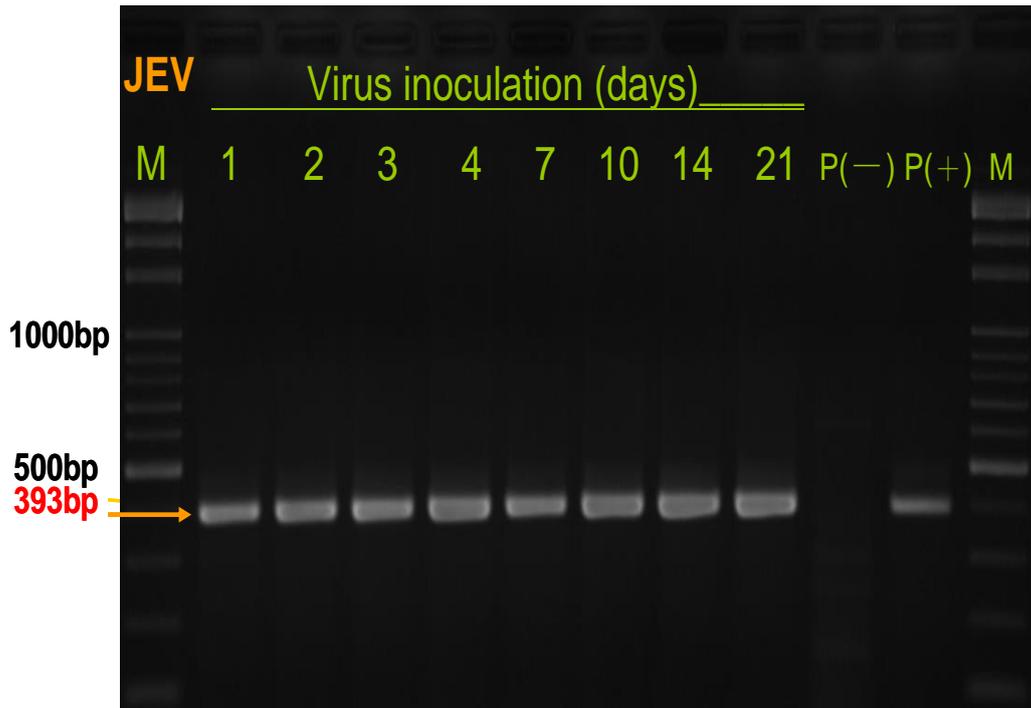
圖二、台灣缺蠟雌蟲注射登革二型病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



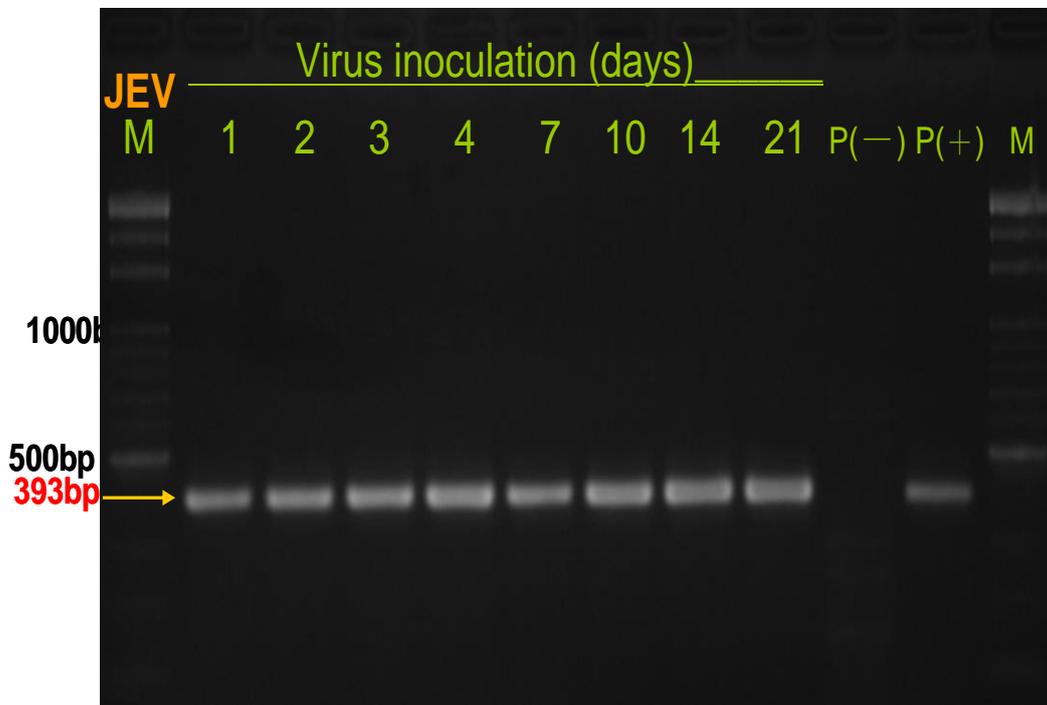
圖三、台灣缺蠓雌蟲注射登革三型病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



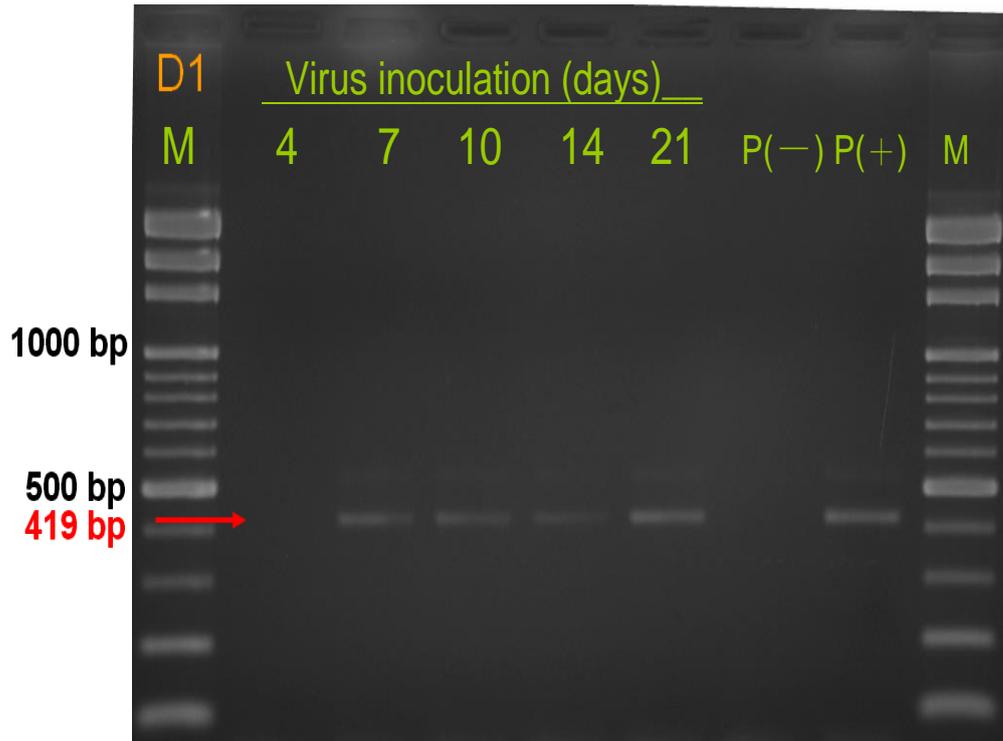
圖四、台灣缺蠓雌蟲注射登革四型病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



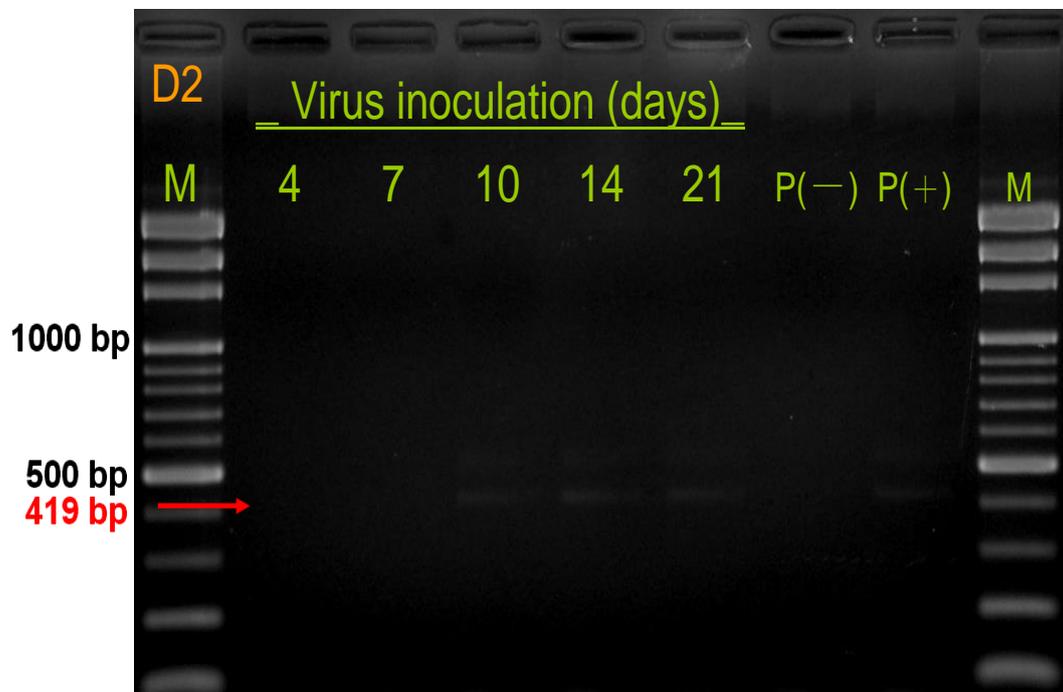
圖五、台灣鈹蠟雌蟲注射日本腦炎病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



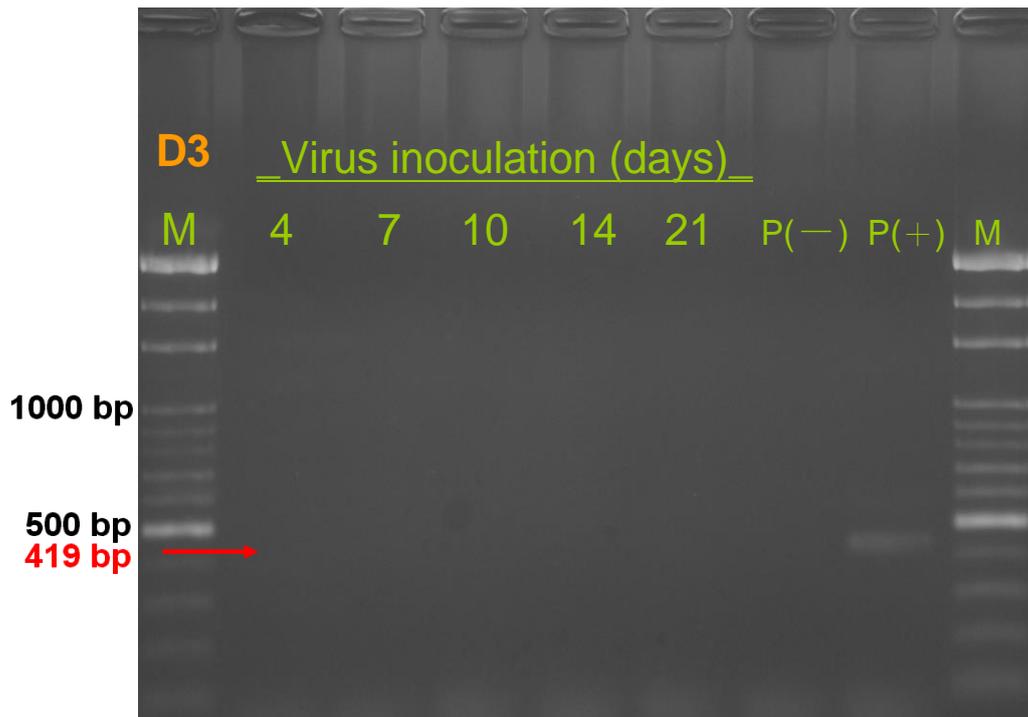
圖六、台灣鈹蠟雌蟲吸食日本腦炎病毒後蟲體內病毒增幅情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



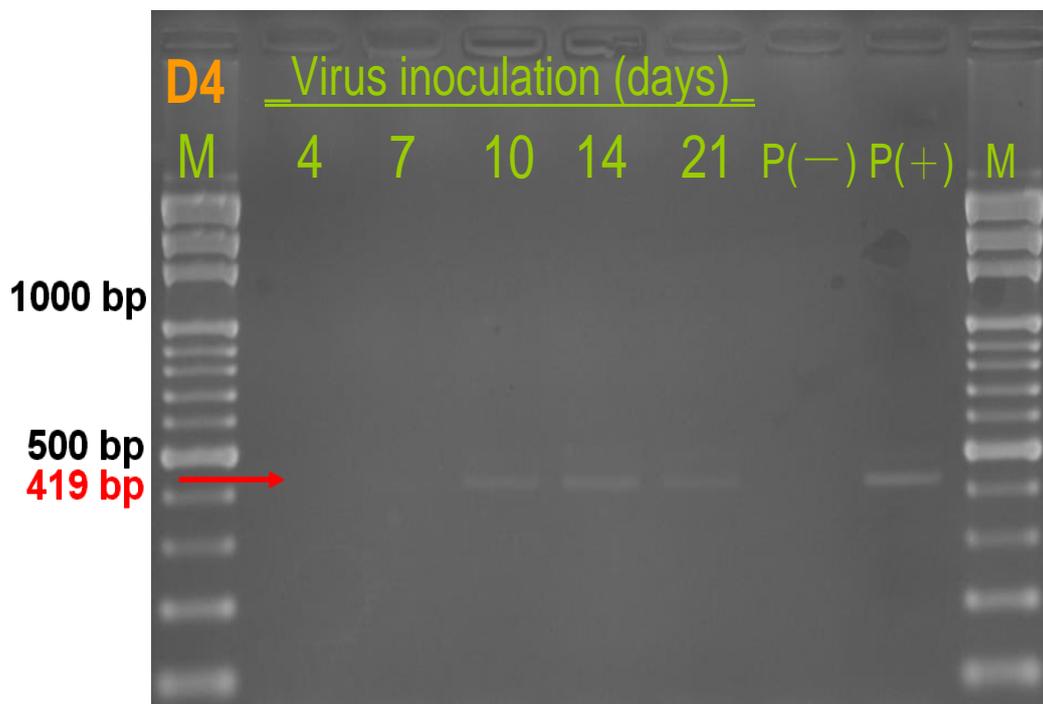
圖七、台灣鈹蠟雌蟲吸食登革一型病毒後蟲體病毒偵測情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



圖八、台灣鈹蠟雌蟲吸食登革二型病毒後蟲體病毒偵測情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



圖九、台灣鈹蠟雌蟲吸食登革三型病毒後蟲體病毒偵測情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。



圖十、台灣鈹蠟雌蟲吸食登革三型病毒後蟲體病毒偵測情形
P(+)為 positive control，P(-)為 negative control。

表一、台灣鈹蠟雌蟲注射登革病毒之蟲體內病毒增幅情形

| Virus strain | Virus Inoculation (day) | | | | | | | |
|--------------|-------------------------|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 14 | 21 |
| Dengue I | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Dengue II | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Dengue III | - | - | - | - | - | + | + | - |
| | - | - | - | - | - | + | + | - |
| Dengue IV | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | - | + | + | + | + | + | + | + |

註：「+」代表蟲體檢測登革病毒為陽性，「-」蟲體檢測登革病毒為陰性
 樣本為 10 隻注射登革病毒之雌蟲以一池方式檢測

表二、台灣鈹蠟注射日本腦炎病毒於蟲體內增幅情形

| Virus strain | Virus Inoculation (day) | | | | | | | |
|--------------|-------------------------|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 14 | 21 |
| JEV | + | + | + | + | + | + | + | + |

註：「+」蟲體檢測日本腦炎病毒為陽性
 樣本為 10 隻注射日本腦炎病毒之雌蟲以一池方式檢測

表三、台灣鈹蠟吸食日本腦炎病毒之感染情形

| Virus strain | Virus Inoculation(day) | | | | | | | |
|--------------|------------------------|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 14 | 21 |
| JEV | + | + | + | + | + | + | + | + |

註：「+」蟲體檢測日本腦炎病毒為陽性

表四、台灣缺蚊雌蟲對黃質病毒感受性

| Virus strain | Virus positive females / tested females* | | | | | | | |
|--------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Virus Inoculation (days) | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 14 | 21 |
| JEV | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 3/3 | 5/5 |
| Dengue I | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 2/4 |
| Dengue II | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 2/5 |
| Dengue III | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| Dengue IV | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 3/4 |

* 蟲體陽性率隻數/總受測隻數