

計畫編號：DOH96-DC-2008

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究發展計畫

台灣地區病媒蚊帶節肢病毒監測系統的建立(第三年)

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：鄧華真

協同計畫主持人：舒佩芸

研究人員：陳健福、呂良振

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

世界上節肢病毒約有 500 種，平時在動物間傳播，野生動物常為增幅或病毒維持的宿主。偶而經由病媒蚊傳播給人，再經過另一類病媒蚊，造成人與人間的流行 (Beaty & Marquardt 1996)。目前各種經蚊蟲傳播的疾病有擴散且增多的跡象，例如西尼羅病毒病在美洲的蔓延(White 2001, Estrada-Franco et al. 2003)，洛斯河熱在南太平洋(Russell 1998)，日本腦炎可藉由風力在澳洲蔓延(Kay & Farrow 2000, Johansen et al. 2003)及瘧疾自根除地區再復甦。世界上較重要經蚊蟲傳播的病毒病包括登革熱、日本腦炎、西尼羅病毒病、東方馬腦炎、西方馬腦炎、委內瑞拉馬腦炎、聖路易斯腦炎、La Cross 腦炎、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 Cross 腦炎)。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)。目前分子生物的技術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。

登革熱因為沒有疫苗可預防，又沒有特效藥可治療，所以為台灣地區經蚊蟲傳染最嚴重的疾病。民國 91 年在台灣南部大流行，登革熱病例數高達 5000 例以上，而出血性登革熱也高達 242 例。疾病管制局因應此波疫情，增加登革熱病媒蚊成蚊監測系統，並檢測成蚊體內帶病毒的感染率。94 年檢測 79,461 隻蚊蟲，檢出 2 池陽性。但皆先有人的病例。成蚊的採集，需要人力以及技巧，耗時耗力。斑蚊產卵有分散風險的行為，所以一個容器內的幼蚊常有可能來不同的雌蚊，且採集容器內的幼蟲較不需要技巧。另外根據垂直傳播的研究指出雖然埃及斑蚊為

傳播登革熱的主要病媒蚊，但白線斑蚊有可能是登革熱病毒自然界的貯主，在非流行季扮演著重要角色(Mitchell 1990, Ashmad et al. 1997, Joshi et al. 2002, de Castro et al. 2004)。近期研究也顯示經卵傳播的埃及斑蚊後代有能力傳播登革熱(Mourya et al. 2001)，所以檢測台灣地區登革熱高危險區的病媒蚊幼蚊病毒感染率，特別是白線斑蚊幼蚊，可以進一步釐清台灣地區登革熱的發生概況。

表一、世界上重要經蚊蟲傳播的節肢病毒及其病媒一覽表(Modified from Beaty & 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	3-12%	猴	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
	發燒	0%		<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
日本腦炎	腦炎	30-40%	鳥類	<i>Culex annulirostris</i>	<i>Culex vishinui</i>
				<i>Culex gelidus</i>	<i>Culex fuscocephalus</i>
				<i>Culex vishinui</i>	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>
				<i>Culex fuscocephalus</i>	
西尼羅病毒病	發燒	7%(美國)	鳥類	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	
				<i>Aedes spp. (4)</i>	<i>Aedes albopictus</i>
				<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i>
				<i>Aedes triseriatus</i>	<i>Aedes vexans</i>
				<i>Aedes vexans</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
				<i>Anopheles spp.(6)</i>	<i>Ochlerotatus dorsalis</i>
				<i>Coquillettidia sp.(1)</i>	<i>Ochlerotatus japonicus</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>					
聖路易斯腦炎	腦炎	4-20%	鳥類	<i>Culex restuans</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
				<i>Culex salinarius</i>	
				<i>Culex nigripalpus</i>	
				<i>Culex pipiens complex</i>	
				<i>Culex tarsalis</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 aegypti</i>
				<i>Aedes africanus</i>	
				<i>Aedes simpsoni</i>	
				<i>Haemagogus spp.</i>	
Togaviridae					
東方馬腦炎	腦炎	50-75%	鳥類	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
				<i>Aedes canadensis</i>	<i>Aedes vexans</i>
				<i>Aedes sollicitans</i>	
				<i>Aedes vexans</i>	
				<i>Coquillettidia perturbans</i>	
				<i>Culex nigripalpus</i>	
				<i>Culex salinarius</i>	

西方馬腦炎	腦炎	5-10%	野鳥	<i>Culisera melanura</i> <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 vigilax</i> <i>Aedes procax</i> <i>Aedes funereus</i>	<i>Ochlerotatus vigilax</i>
屈公病	出血熱發燒	稀少	猴	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<hr/>					
Bunyaviridae					
La Crosse encephalitis	腦炎	1%	Small mammals (例如花栗鼠 <i>Tamias striatus</i>)	<i>Aedes Canadensis</i> <i>Aedes communis</i> <i>Aedes dorsalis</i> <i>Aedes melanimon</i> <i>Aedes stimulans</i> <i>Aedes triseriatus</i> <i>Culiseta inornata</i>	
裂谷熱	發燒	0%	牛 羊 駱駝	<i>Aedes caspius</i> <i>Aedes dalzieli</i> <i>Aedes mcintoshi</i> <i>Aedes vexans arabiensis</i> <i>Aedes ochraeus</i> <i>Anopheles coustani</i> <i>Culex perexiguus</i> <i>Culex pipiens complex</i> <i>Culex poicilipes</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> <i>Mansonia africana</i> <i>Mansonia uniformis</i>	<i>Aedes vexans</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Culex tritaeniorhynchus</i> <i>Mansonia uniformis</i>

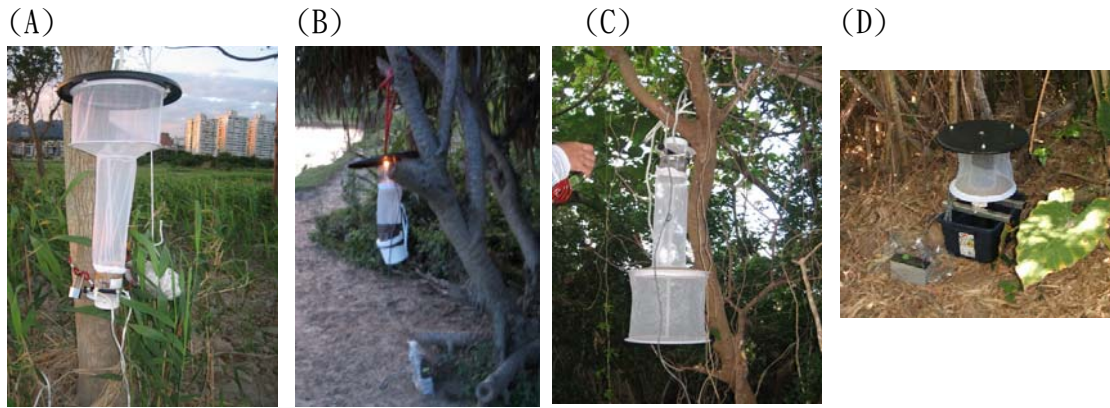
材料與方法

(一) 節肢病毒病媒蚊監測及檢驗

1. 野外病媒蚊採集

(1) 腦炎性節肢病毒病媒蚊採集

於於台北市野鳥聚集地區(關渡自然公園及動物園)，每月1次，每次兩個點，進行長期監測，每天於下午17:00-18:00左右放置上吸式、下吸式捕蚊燈(上置乾冰誘引)、CDC捕蚊燈(上置乾冰誘引)、孕母誘蚊器(內加酵母菌溶液)等各一個。第二天早上8:00-9:00左右收燈，蚊蟲檢體直接放入乾冰凍死，帶回實驗室鑑定種類使用冷盤(Chilled table)或碎冰鑑定種類後，以同一地區同一個誘集方法，至多50隻同種蚊蟲放入離心管後，置於-20°C或-80°C冰箱，等待病毒檢驗。另外於蚊蟲密度較高季節(4-8月)，增加人工掃網採集，以評估此法與其他誘蚊工具的差別。



圖一、上吸式捕蚊燈(A)、下吸式捕蚊燈(B)CDC 捕蚊燈(C)及孕母誘蚊器(D)。

(2) 登革熱病媒蚊採集

於南部地區定期前往家戶進行掃網捕捉斑蚊成蚊，鑑定種類後，冷藏寄回實驗室先以黃病毒及 α 病毒群體引子進行體內帶病毒檢測。若為陽性，則電泳跑膠確認產物大小後，以基因定序進入資料庫比對後，確認疾病種類。

2. 病媒蚊體內病毒 RNA 的萃取方法

(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 3 mm 玻璃珠。

BA-1 溶液 1 X medium 199 with Hanks' balanced salt solution ,0.05 M Tris Buffer(PH7.6)

1 % bovine serum albumin

0.35 g sodium bicarbonate /L

100 U streptomycin /L

100 U penicillin

25 ug amphotericin B(Fungizone)/ml

(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 μ l 上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中，並加入 150 μ l BA-1 溶液，混和均勻。

(5) 吸取 560 μ l 含有 carrier RNA 的 AVL 溶液至 1.5ml 微量離心管中，並加入 140 μ l 步驟 4 的液體，vortex 1 分鐘混合均勻。

(6) 室溫(15 ~ 25 $^{\circ}$ C)下作用 10 分鐘。

(7) 加入純酒精 560 μ l，震盪約一分鐘以終止反應。

(8) 利用小烏龜離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。

(9) 將上述混合液 630 μ l 分兩次加至 QIAamp spin column (放置於 2ml collection tube 上)，蓋上蓋子，以 14000 rpm 轉速離心 2 分鐘，將 QIAamp spin column 放置新的 2ml collection tube 上。

- (10) 小心打開 QIAamp spin column 的蓋子，加入 500 μ 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 μ 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 μ 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°C 或 -80°C ，進行後續病毒檢測用。

3. 蚊蟲體內帶腦炎性節肢病毒 SYBR Green real-time RT-PCR 檢驗方法

(Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Cat NO.204243))

- (1) 取出 Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Master Mix, RNase-free waer), primers, 待溶解後離心 (spin-down), 立即置於冰上。
- (2) 依序加入以下試劑

Component	Volumn/reaction	Final concentration
1. 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Maser Mix	25 μ l	1X
2. RNase-free water	Variable	
3. Foeward primer	Variable	
4. Reverse primer	Variable	
QuantiTect RT Mix	0.5 μ l	
Total	40 μ l	

配製時多加一份的量，全程於冰上操作，首先加入 RNase-free water，再依序加入 primer 及 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Maser Mix，最後加入 QuantiTect RT Mix。

測 Alphavirus group 專用 primer

AL-2 5'-TAA TGC CAG AGC GTT TTC GCA-3'

AL-3 5'-GTG GTG TCA AAC CCT ATC CA-3'

測 Flavivirus group 專用 primer

FL-F 5' GCC ATA TGG TAC ATG TGG CTG GGA GC-3'

FL-R1 GTG/T ATT CTT GTG TCC CAT/A CCG GCT GTG TCA TC-3'

FL-R2 GTG ATG CGG/A GTG TCC CAG CCA/G GCT/G GTG TCA TC-3'

- (3) 加入 40 μ l Master Mix 至 Q-PCR 專用試管

- (4) 加入檢體、陽性、陰性對組 RNA

蚊子檢體：純化出之 RNA，取 10 μ l

陽性對照組：以日本腦炎（家蚊屬蚊蟲）或登革熱（斑蚊屬蚊蟲）（黃病毒屬）及 Sindy (α 病毒屬) 病毒 RNA 稀釋 10 倍後，加 10 μ l。

陰性對照組：NTC (Non-Template Control)，加 10 μ l RNase-free water。

(5) 蓋上 Q-PCR 專用試管蓋子，輕輕搖晃混和均勻，離心 (spin down)。

(6) 用 MX4000 進行反應及分析結果。

溫度程式

Step	Cycles	Time	Temperature
Reverse Transcription	1	30 min	50°C
PCR Initial Activation	1	15 min	95°C
Denaturation	45	15 sec	94°C
Annealing	45	30 sec	55°C
Extension	45	20 sec	72°C
	45	30 sec	77°C
Dissociation Curve	1	1 min	95°C
	45		\uparrow 0.5°C/cycle/ 30sec 68°C

(7) 以 SYBR Green real-time RT-PCR 檢驗結果若 Ct 值低於 40 及/或 Tm 值高於 79，則以電泳跑膠比對產物大小。若產物大小與陽性對照組相同，則將產物定序後，進入 NCBI 資料庫比對，另外也會進行病毒培養分離，以確認病毒種類。

(8) 蚊蟲種類病毒最低感染率 = (該種蚊蟲病毒陽性池數 / 該種蚊蟲測試蚊蟲總數) * 100。

(二) 登革熱病媒蚊幼蟲檢驗

於實驗室以病毒不同濃度混合四齡幼蟲隻數，以 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、及 100 隻為 1 池，建立登革熱病媒蚊幼蟲檢驗隻數，並採集 96 年登革熱本土病例發生地區 (台南市) 登革熱病媒蚊幼蟲進行檢測。

結果

一、蚊蟲調查工具及方法比較

以孕母誘蚊器加上酵母菌及誘蚊燈加乾冰比較蚊蟲誘集效果，發現蚊蟲種類及隻數均有顯著差異 ($F_{3,172} = 7.01, P < 0.00$; $F_{3,172} = 3.04, P < 0.05$)，而此差異來自雌蚊數 ($F_{3,172} = 3.05, P < 0.05$)，但不是雄蚊數 ($F_{3,172} = 0.49, P > 0.05$) (表二)。下吸式 UD 誘蚊燈加乾冰所誘得之蚊蟲種類及隻數均最多，共 27 種 5,291 隻，上吸式 UD 誘蚊燈次之 (23 種 3,485 隻)，接著為 CDC 誘蚊燈加乾冰 (24 種 2,989 隻) 及孕母誘蚊器加酵母菌 (13 種 291 隻)。

表二、96年蚊蟲調查工具比較結果。

項目	樣本數	下吸式UD誘蚊燈+乾冰	上吸式UD誘蚊燈+乾冰	CDC誘蚊燈+乾冰	孕母誘蚊器	F _{3,172}	P
蚊蟲種類數目	44	5.66	4.09	3.95	1.25	7.01	0.00
雌蚊數	44	113.09	75.59	63.64	5.68	3.05	0.03
雄蚊數	44	3.09	2.77	2.93	0.84	0.49	0.69
總數	176	116.18	78.36	66.57	6.52	3.04	0.03

以所誘得的蚊蟲種類分析，下吸式UD誘蚊燈加乾冰誘得三斑家蚊最多，共3,364隻，佔63.58%，接著為斑腳沼蚊(1253隻，佔23.68%)、環紋家蚊(160隻，佔3.02%)、白線斑蚊(152隻，佔2.87%)、熱帶家蚊(85隻，佔1.61%)、紅胸家蚊(68隻，佔1.29%)等(表三)。上吸式UD誘蚊燈加乾冰誘得三斑家蚊最多，共2,503隻，佔71.62%，接著為斑腳沼蚊(607隻，佔17.37%)、環紋家蚊(153隻，佔4.38%)、白線斑蚊(74隻，佔2.12%)、紅胸家蚊(51隻，佔1.46%)、熱帶家蚊(30隻，佔0.86%)、等。CDC誘蚊燈加乾冰所誘得的蚊蟲種類以斑腳沼蚊最多(1,481隻，佔49.55%)，其次為三斑家蚊(1,028隻，佔34.39%)、白線斑蚊(167隻，佔5.59%)、環紋家蚊(164隻，佔5.49%)、熱帶家蚊(38隻，佔1.27%)等。孕母誘蚊器加酵母菌誘得的蚊蟲種類以斑腳沼蚊最多(195隻，佔67.01%)、白線斑蚊次之(33隻，佔11.34%)，接著為熱帶家蚊(18隻，佔6.19%)、三斑家蚊(16隻，佔5.50%)、雙角家蚊(11隻，佔3.78%)等。於5-8月份以人工掃網在晚上17:00-20:00間，採集到的蚊種以斑腳沼蚊最多(380隻，35.58%)，三斑家蚊次之(264隻，24.72%)，接著為白線斑蚊(245隻，22.94%)、熱帶家蚊(112隻，10.49%)等。

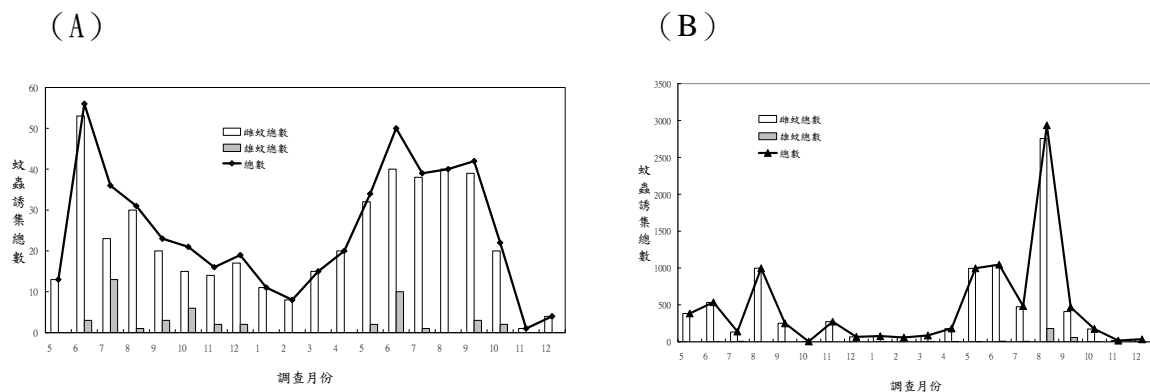
表三、以不同調查方法所採集的蚊蟲種類。

蚊蟲種類	調查工具								人工掃網			
	調查次數	下吸式UD誘蚊燈		上吸式UD誘蚊燈		CDC誘蚊燈		孕母誘集器		掃網		
		陽性次數	蚊蟲總數	陽性次數	蚊蟲總數	陽性次數	蚊蟲總數	陽性次數	蚊蟲總數	調查次數	陽性次數	蚊蟲總數
三斑家蚊	44	27	3364	25	2503	22	1028	5	16	22	6	264
斑腳沼蚊	44	14	1253	14	607	18	1481	7	195	22	4	380
環紋家蚊	44	18	160	12	153	11	164	1	1	22	2	7
白線斑蚊	44	27	152	16	74	24	167	12	33	22	13	245
熱帶家蚊	44	19	85	14	30	15	38	8	18	22	8	112
紅胸家蚊	44	7	68	9	51	5	23	3	4	22	4	13
莫氏家蚊	44	7	62	4	8	4	14	0	0	22	2	6
竹生翠蚊	44	8	29	2	2	8	24	0	0	22	2	8
二斑家蚊	44	6	16	2	2	3	3	0	0	22	0	0
多斑瘧蚊	44	10	15	6	12	7	14	2	2	22	0	0
白肋小蚊	44	1	13	1	1	0	0	0	0	22	1	1
中華瘧蚊	44	5	12	4	4	3	3	0	0	22	1	1
白肋斑蚊	44	5	10	2	2	2	2	0	0	22	0	0
呂宋妙蚊	44	5	10	5	12	2	2	0	0	22	2	3
白腹叢蚊	44	6	8	1	1	1	2	0	0	22	4	17

澎湖斑蚊	44	2	7	2	3	3	6	3	3	22	0	0
芋生叢蚊	44	5	7	4	4	2	2	0	0	22	1	1
灰胸家蚊	44	2	3	1	1	4	5	1	2	22	1	2
白吻家蚊	44	3	3	1	1	1	1	0	0	22	0	0
台灣黑蚊	44	2	3	1	1	1	3	0	0	22	0	0
黃尾家蚊	44	2	3	5	6	2	2	1	1	22	0	0
小形家蚊	44	2	2	1	3	0	0	0	0	22	2	3
側白黃蚊	44	1	2	0	0	0	0	0	0	22	0	0
袋蓮荷蚊	44	1	1	0	0	0	0	0	0	22	0	0
雙角家蚊	44	1	1	0	0	0	0	8	11	22	3	3
蛛形翠蚊	44	1	1	0	0	1	1	0	0	22	0	0
新小黑蚊	44	1	1	4	4	3	3	1	1	22	0	0
哈氏家蚊	44	0	0	0	0	0	0	2	4	22	0	0
中華家蚊	44	0	0	0	0	0	0	0	0	22	2	2
種類總數		27種	5291	23種	3485	24種	2989	13種	291		17種	1068

二、台北地區蚊蟲密度消長

於民國 95 年 5 月至 96 年 10 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 96 年密度較 95 年高，而北投區蚊蟲密度遠較文山區密度高。在文山區所誘得的蚊蟲在 6 月份最多，9 月份後逐月遞減，而雄蚊分別在 6 月及 7 月份有高峰（圖一 A）。在台北市北投區則在 8 月份誘集到最多的蚊蟲，次高峰發生於 5-6 月（圖二 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

(一) 檢驗結果

今年截至目前為止，共檢測 5,669 池 30,707 ♀ 7,981 ♂。病媒蚊帶病毒檢體來源有多種(1)自泰國、印度及越南班機內採集的熱帶家蚊 26 池(53 ♀ 7 ♂)，(2)由南部登革熱各縣市衛生局及疾病管制局所採的斑蚊檢體，共 4, 443 池，包括埃及斑蚊 6960 ♀ 5932 ♂、白線斑蚊 7927 ♀ 804 ♂及三斑家蚊 78 ♀，(3)疾病管制局因應台南市登革熱疫情檢體 427 池，白線斑蚊 1,132 ♀ 314 ♂、埃及斑蚊 128 ♀ 143 ♂、其他蚊種 89 ♀ 47 ♂，(4)自行前往關渡自然公園、木柵動物園、豬舍等野鳥、候鳥及動物聚集的區域採集，共檢測 773 池 14,340 隻蚊蟲，其中三斑家蚊 8,865 ♀ 60 ♂、斑腳沼蚊 3511 ♀ 404 ♂、白線斑蚊 603 ♀ 92 ♂、環紋家蚊 525 ♀ 11 ♂、熱帶家蚊 293 ♀ 85 ♂、紅胸家蚊 91 ♀ 64 ♂、莫氏家蚊 82 ♀ 1 ♂、中華瘧蚊 81 ♀ 1

♂及其他蚊種 289♀16♂。檢驗結果於南部縣市衛生局採樣檢體發現黃病毒屬 1 池陽性，後經定序比對結果為登革病毒第一型。11 月份埃及斑蚊雌蚊病毒最低感染率為 0.11%，而最低年感染率為 0.014%。此一陽性池數為 96 年 11 月 8 日高雄市衛生局採集自三民區的埃及斑蚊雌蚊 40 隻。另外於自行採樣檢體中發現黃病毒屬 6 池陽性（表四），後經電泳跑膠確認後，經定序比對結果為日本腦炎，其中 4 池分離出日本腦炎病毒株。台北市北投區關渡里 6 月份三斑家蚊雌蟲最低感染率為 0.82%，而年感染率為 0.17%。此 6 池陽性池數為 96 年 6 月 29 日在台北市北投區 UD 誘蚊燈所誘集之三斑家蚊雌蚊 288 隻（其中 1 個點 4 池陽性出自 2 盞誘蚊燈，每池 50 隻，另外 1 個點 2 池陽性出自同一盞燈，隻數 1 池為 50 隻，另一池為 38 隻）。檢驗 Alpha 病毒 5669 池，結果均為陰性。

表四、96 年野外蚊蟲體內帶病毒檢驗結果。

蚊蟲來源	蚊蟲種類	檢驗池數	檢驗蚊蟲隻數			檢驗結果	
			雌蚊	雄蚊	總數	黃病毒群	α 病毒群
飛機航班	熱帶家蚊	25	52	7	59	0	0
	二斑家蚊	1	1	0	1	0	0
	合計	26	53	7	60	0	0
南部縣市衛生局登革熱監測檢體	埃及斑蚊	2166	6960	5932	12892	1 (登革熱第一型)	0
	白線斑蚊	2274	7927	804	8731	0	0
	三斑家蚊	3	78	0	78	0	0
	合計	4443	14965	6736	21701	1	0
因應台南市疫情檢體	埃及斑蚊	100	128	143	271	0	0
	白線斑蚊	282	1132	314	1445	0	0
	白腹叢蚊	19	16	15	31	0	0
	黃尾家蚊	1	48	15	63	0	0
	熱帶家蚊	19	16	15	31	0	0
	鹹水家蚊	6	9	2	11	0	0
	合計	427	1349	504	1852	0	0
自行採集	三斑家蚊	230	8865	60	8925	6 (日本腦炎)	0
	斑腳沼蚊	124	3511	404	3960	0	0
	白線斑蚊	92	603	92	695	0	0
	環紋家蚊	49	525	11	536	0	0
	熱帶家蚊	67	293	85	378	0	0
	紅胸家蚊	25	91	64	155	0	0
	莫氏家蚊	11	82	1	83	0	0
	中華瘧蚊	13	81	1	82	0	0
	竹生翠蚊	20	60	0	60	0	0
	多斑瘧蚊	24	41	1	42	0	0
	白腹叢蚊	14	22	7	29	0	0
	呂宋妙蚊	12	20	4	24	0	0
	澎湖斑蚊	10	21	0	21	0	0
	二斑家蚊	10	19	1	20	0	0
	芋生叢蚊	13	15	0	15	0	0
	雙角家蚊	12	15	0	15	0	0
	白肋斑蚊	9	14	0	14	0	0
白肋小蚊	1	13	0	13	0	0	
灰胸家蚊	8	11	1	12	0	0	

	黃尾家蚊	7	8	0	8	0	0
	台灣黑蚊	4	7	0	7	0	0
	哈氏家蚊	4	6	0	6	0	0
	小形家蚊	2	2	2	4	0	0
	白吻家蚊	4	4	0	4	0	0
	白頭家蚊	1	3	0	3	0	0
	蛛形翠蚊	3	3	0	3	0	0
	側白黃蚊	1	2	0	2	0	0
	新黑小蚊	2	2	0	2	0	0
	袋蓮苛蚊	1	1	0	1	0	0
	總計	773	14,340	734	15119	6	0
總計		5669	30707	7981	38732	7	0

(二) 登革熱蚊蟲檢體取樣及運送分析

今年登革熱疫情由台南市開始，6月份病例41例、7月份165例、8月份205例、9月份187例、10月份520例。南部縣市採集的斑蚊，每月份均有檢體，以6-9月最多（表五），而檢驗結果於11月份發現1池登革病毒陽性，第一型。台南市檢體自3月份至11月份，共有埃及斑蚊436♀327♂及白線斑蚊429♀90♂（表六）。其中6月份發生疫情的安南區於6月份及7月份採集47隻及39隻供檢驗。疾病管制局特別於今年7月底及10月份前往台南市採取檢體埃及斑蚊128♀143♂，白線斑蚊2,314♀1,445♂，其他蚊種89♀47♂，而這些檢體均為活體送回實驗室，凍死後鑑定種類及性別。

表五、96年南部各縣市每月採集的斑蚊檢驗隻數。

調查月份	陽性池數	檢驗總數	埃及斑蚊		白線斑蚊	
			雌蚊	雄蚊	雌蚊	雄蚊
1	0	254	86	107	47	14
2	0	540	106	151	257	26
3	0	1500	524	745	217	14
4	0	1808	510	530	698	70
5	0	2360	712	878	684	86
6	0	3626	826	844	1555	401
7	0	2298	674	560	988	76
8	0	2689	785	650	1226	28
9	0	3249	1107	818	1290	34
10	0	1462	590	385	441	46
11	1	1336	908	167	259	2
合計	1	21122	6828	5835	7662	797

表六、96年台南市各月份登革熱病媒蚊檢體區別。

調查月份	區別	總數	埃及斑蚊雌蚊	埃及斑蚊雄蚊	白線斑蚊雌蚊	白線斑蚊雄蚊
3	中西區	23	7	16	0	0
	北區	18	3	13	2	0
	安平區	3	2	0	1	0
	安南區	22	7	13	2	0
	東區	13	3	9	0	1
	南區	14	5	6	2	1
4	中西區	4	3	0	1	0
	北區	19	10	8	1	0
	安平區	2	0	0	2	0
	安南區	32	7	15	10	0
	東區	13	8	0	5	0
	南區	31	23	8	0	0
5	中西區	15	6	6	3	0
	北區	48	17	23	5	3
	安平區	8	2	3	3	0
	安南區	36	8	15	13	0
	東區	6	5	0	1	0
	南區	9	3	6	0	0
6	中西區	12	3	3	6	0
	北區	15	8	6	1	0
	安平區	4	2	0	0	2
	安南區	47	18	8	21	0
	東區	25	5	2	8	10
	南區	35	12	16	7	0
7	中西區	13	2	3	8	0
	北區	48	15	20	11	2
	安平區	2	0	1	1	0
	安南區	39	19	2	18	0
	東區	20	4	0	16	0
	南區	4	1	1	2	0
8	中西區	21	7	11	3	0
	北區	25	15	5	3	2
	東區	20	12	3	4	1
	南區	22	14	1	7	0
9	中西區	2	0	0	2	0
	北區	60	24	26	10	0
	安平區	5	1	0	4	0
	安南區	9	2	0	7	0
	東區	93	13	25	33	22
	南區	6	5	0	1	0

10	中西區	99	14	5	44	36
	北區	57	27	2	28	0
	安平區	36	4	0	31	1
	安南區	27	4	0	21	2
	東區	68	38	1	29	0
	南區	71	7	9	51	4
11	中西區	8	4	4	0	0
	北區	8	2	5	0	1
	安南區	45	29	15	0	1
	南區	10	2	8	0	0
	東區	10	4	4	1	1
合計		1282	436	327	429	90

以黃病毒群體引子檢測蚊蟲 5,563 池，其中 Ct 值小於或等於 40 且 Tm 值大於或等於 79 有 10 池（表四），也就是 PCR 檢測結果為陽性，但經過電泳跑膠後，有 6 池有相似產物（958 bp），1 池，再經基因定序比對結果 6 池為日本腦炎 1 池為登革熱，而日本腦炎 6 池中培養分離出日本腦炎病毒 4 株。用 alpha 群體引子檢驗 5,563 池，其中 Ct 值小於或等於 40 且 Tm 值大於或等於 80 有 1 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 ≥ 79	Tm < 79	合計		Ct	Tm
Ct ≤ 40	10	11	21	陽性	26.3-39.2	79.4-86.3
Ct > 40	261	5281	5542	陰性	42.0-未檢出	65.8-77.5
合計	271	5292	5563			

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	1	17	18	陽性	24.3-34.7	80.1-83.4
Ct > 40	162	5383	5545	陰性	43.3-未檢出	67.2-79.2
合計	163	5400	5563			

四、登革熱病媒蚊幼蚊帶病毒檢驗

進行登革熱幼蟲測試，共測試埃及斑蚊四齡幼蟲隻數 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、及 100 隻，結果建議四齡檢驗隻數應在 20 隻以下(表六)。台南市疫區採集的埃及斑蚊幼蚊 34 隻，蛹 17 隻，白線斑蚊幼蟲 260 隻，蛹 29 隻，共 25 池，均為陰性。

表六、埃及斑蚊四齡幼蟲登革病毒檢驗隻數。

幼蟲隻數	Ct	Tm
100	未檢出	78.4
90	未檢出	73.7
80	未檢出	79.4
70	未檢出	79.4
60	未檢出	73.8
50	未檢出	79.0
40	未檢出	79.4
30	42.20	79.7
20	36.34	80.0
10	31.66	80.0
0	27.48	80.0

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 5,563 池，其中 PCR 黃病毒疑似陽性池數 10 池，而 α 病毒疑似陽性池數 1 池，但經過電泳跑膠後排除黃病毒疑似陽性池數 3 池及 α 病毒疑似陽性池數 1 池，最後經基因定序比對確認登革熱陽性 1 池及日本腦炎陽性 6 池。蚊蟲病毒感染率均很低，台北市北投區關渡里日本腦炎三斑家蚊雌蚊病毒感染率 95 年為 0.04% (6 月份為 0.23%)，而 96 年為 0.17% (6 月份為 0.82%)。埃及斑蚊雌蚊登革病毒年感染率最低為 0.014% (11 月份感染率為 0.11%)。應依各種疾病特性，不定期前往危險地區檢測，以了解台灣地區病媒蚊帶病毒現況。

95 年登革熱病媒蚊檢體以登革熱引子檢出高雄市病媒蚊 8 池，而今年以群體引子檢測出 1 池，原因可能為(1)因檢體包括不少的埃及斑蚊雄蟲推測，所採集的埃及斑蚊多為剛羽化的成蚊，採樣的地點多在孳生源附近。(2)採樣的時機為緊急噴藥殺死成蚊後。(3)因為有效的疑似病例及確定病例防治策略，導致台灣地區大部分的蚊蟲均沒有帶病毒，而病毒的擴散係因登革熱病人的活動造成。

所以帶病毒蚊蟲最佳的採樣時間及地點為尚未噴藥前之疑似病例及其附近的住家或往年曾發生登革熱流行的村里。

本年度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，且下吸式比上吸式效果較好。因為上吸式為倒掛的誘蚊燈，調查時發現蚊蟲會集中於進出口處。其中 6 池蚊蟲共 288 隻雌蚊檢出日本腦炎病毒。另外亦於 4 月份至 9 月份蚊蟲密度較高的季節進行人工掃網，但均未檢出病毒。UD 誘蚊燈對三斑家蚊、斑腳沼蚊等誘引效果好，而人工採集亦可採到此兩種蚊蟲、白線斑蚊及熱帶家蚊。

結論與建議

- 一、應依疾病特性，前往疾病高危險地區採集病媒蚊，利用群體引子定期進行蚊蟲檢驗，可瞭解台灣地區病媒種類及其所攜帶的病毒，建立長期資料庫，同時可以監測經蚊蟲傳播新興病毒的入侵。
- 二、三斑家蚊及斑腳沼蚊，可用 UD 誘蚊燈加乾冰誘引，而熱帶家蚊及白線斑蚊可用人工掃網法來採集。
- 三、台北市自然公園於 95 年 6 月份檢出 1 池日本腦炎病毒，96 年 6 月檢出 6 池日本腦炎病毒，顯示 6 月份為該地區之危險月份，應在該月份進行病媒蚊防治工作，以減少附近住家日本腦炎感染風險。
- 四、今年登革熱病媒蚊檢體檢驗結果於 11 月份高雄市三民區檢出，而台南市雖然病例超過 1000 例，卻沒有檢出，可能係因登革病毒的擴散靠病人移動而傳播，所以緊急防治時，除按照病例進行緊急噴藥外，對於病人移動的範圍（特別是附近的村里）及病媒密度高的地區亦應採取預防性防治措施。
- 五、登革熱病媒蚊檢體最佳的採樣時間及地點為尚未噴藥前之疑似病例及其附近的住家或往年曾發生登革熱流行的村里。

計畫重要研究成果及具體建議

此計畫比較不同誘蚊工具誘蚊效果，並利用兩個病毒群體引子來檢驗蚊蟲體內帶病毒情況，研究結果發現下吸式 UD 誘蚊燈加乾冰效果最佳，其所誘得之蚊蟲於 95 年檢出 2 池日本腦炎病毒，96 年檢出 6 池日本腦炎病毒，1 池登革病毒。建議可利用此誘蚊燈及病毒檢驗方法，依疾病特性不定期至高風險地區篩檢台灣地區病媒蚊體內帶病毒現況。

參考文獻

- 連日清。臺灣蚊種檢索。藝軒圖書出版社，2004。
- Ahmad R, Ismail A, Saat Z, Lim LH. 1997. Detection of dengue virus from field *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28: 138-142.
- Beaty BJ, and Marquardt WC: The biology of disease vectors. The University Press of Colorado, Colorado, USA, 85-97pp, 1996.
- Boom AK, Lindsay MD, Wright AE, Smith DW, Mackenzie JS. 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* 2003;69 277-283..
- Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. 2005.

- Duplex Reverse Transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J. Clin. Micro.* 43: 696-702.
- Center for Disease Control. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for surveillance, prevention, and control. 2003, 75pp.
- De Castro MG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourence-de-Oliveira R. 2004. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 809-814.
- 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.
- Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 158-161.
- 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.
- Kuno G. 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Method* 72: 27-41.
- 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.
- Mitchell CJ, Miller BR. 1990. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 6:251-253.
- 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.
- Mourya DT, Gokhale MD, Basu A, Barde PV, Sapkal GN, Padbidri VS, Gore MM. 2001. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta virologica* 45: 67-71.
- 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.
- Traore-Lamizana M, Fontenille D, Diallo M, Ba Y, Zeller HG, Mondo M, Adam F,

- Thonon J, Maiga A. 2001. Arbovirus surveillance from 1990 to 1995 in the Barkedji area (Ferlo) of Senegal, a possible natural focus of rift valley fever virus. *J. Med. Entomol.* 38: 480-492.
- Van der Hurk AF, Nisbet DJ, Foley PN, Ritchie SA, Mackenzie JS, and Beebe NW. 2002. Isolation of Arbobiruses from Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected from the Gulf Plains Region of Northwest Queensland, Australia. *J. Med. Entomol.* 39: 786-792.
- 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.