

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000117

衛生福利部疾病管制署 104 年委託科技研究計畫

計畫名稱：病媒蚊在不同溫度下對登革病毒感染能力影響

年度研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗及疫苗研發中心

計畫主持人：鄧華真

協同計畫主持人：舒佩芸

研究人員：陳典煌

執行期間： 104 年 01 月 01 日至 104 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

目次	頁碼
壹、摘要.....	(5)
貳、本文	
一、前言.....	(7)
二、材料與方法.....	(10)
三、結果.....	(13)
四、討論.....	(17)
五、結論與建議.....	(19)
六、重要研究成果及具體建議.....	(20)
七、參考文獻.....	(20)
八、圖表.....	(24)

圖次	頁碼
圖一、87年至104年台灣地區登革熱本土病例趨勢圖.....	(24)
圖二、87年至104年台灣地區登革熱本土病例分布圖.....	(24)
圖三、病毒液序列稀釋再加上頭部組織(A)、病毒液序列稀釋再加上 蚊子唾液組織(B)及病毒液序列稀釋再加上身體組織之標準曲線 圖.....	(25)
圖四、蚊子感染登革病毒第一型後，在 10°C 環境下，身體組織(A)、 唾液組織(B)及頭部組織(C)病毒量的時間變化.....	(26)
圖五、蚊子感染登革病毒第一型後，在 16°C 環境下，身體組織(A)、 唾液組織(B)及頭部組織(C)病毒量的時間變化.....	(27)
圖六、蚊子感染登革病毒第一型後，在 22°C 環境下，身體組織(A)、 唾液組織(B)及頭部組織(C)病毒量的時間變化.....	(28)
圖七、蚊子感染登革病毒第一型後，在 28°C 環境下，身體組織(A)、 唾液組織(B)及頭部組織(C)病毒量的時間變化.....	(29)
圖八、蚊子感染登革病毒第一型後，在 34°C 環境下，身體組織(A)、 唾液組織(B)及頭部組織(C)病毒量的時間變化.....	(30)
圖九、不同溫度下(10-34°C)，頭部組織(A)、唾液組織及頭部組織 登革病毒複製的速度.....	(31)

表次

頁碼

表一、感染登革病毒第一型後，在不同溫度環下埃及斑蚊的

存活率..... (32)

計畫中文摘要

此研究計畫探討溫度對病毒複製速度以及病毒外在潛伏期的影響。將埃及斑蚊感染第一型登革病毒後，分別飼養在 10°C、16°C、22°C、28°C、34°C 等不同溫度下，並於感染後第 0、5、10、15、20、25、30 日等時間點收蚊子檢體，並取其身體、唾腺、頭部組織進行病毒定量實驗。實驗結果顯示飼養於 28°C 或 34°C 的環境下的埃及斑蚊，經過感染後 15 天仍有 80% 的存活率，到了感染後 30 天其存活率分別為 80% 與 70%。飼養於 22°C、16°C、10°C 環境的埃及斑蚊，在感染後 15 天存活率分別為 60%、50%、0%，到了感染後 30 天則所有埃及斑蚊皆死亡。埃及斑蚊在 28°C 或 34°C 的環境下有較高的病毒複製速度與病毒量，而飼養於 34°C 的埃及斑蚊其唾腺組織病毒量在感染後第 10、15 日都高於飼養於 28°C 的埃及斑蚊唾腺組織，到了感染後 20 天則是彼此差異不大。飼養於 22°C 的埃及斑蚊其身體及唾腺組織的病毒量在感染後第 5、10 天明顯少於培養在 28°C 及 34°C 的埃及斑蚊。在 16°C 培養的埃及斑蚊其身體組織偵測到的病毒量在感染後第 0 天至第 15 天變化不大，唾腺組織在感染後第 10-15 天可偵測到少量病毒。在 10°C 培養的埃及斑蚊其身體組織的病毒量在感染後第 5-10 天呈現下降的趨勢，在唾腺組織則是無法偵測到病毒。在頭部組織的部份，培養於 22°C、28°C、34°C 的埃及斑蚊其頭部組織所偵測到的病毒量差異不大，培養於 16°C 的埃及斑蚊僅有一隻偵測到少量病毒，培養於 10°C 的埃及斑蚊則未偵測到病毒。

關鍵詞：埃及斑蚊、登革病毒、溫度、臺灣

計畫英文摘要：

In this study, we evaluate the impact of temperature on the dengue virus replication in extrinsic incubation period of *Aedes aegypti*. After orally infection of dengue serotype 1 virus to *Aedes aegypti* females, the body, salivary gland, and head tissues were detected for virus titers after 0、5、10、15、20、25 and 30 days of post infection(dpi). The result showed that the survival rates of mosquitoes incubated at 28 °C or 34 °C were maintained 70-80% before 30 dpi. The survival rates of mosquitoes incubated at 10°C, 16°C and 22 °C were 0%, 50%, and 60% respectively after 15 dpi and all mosquitoes were dead at 30 dpi. Virus titers were detected much higher in body tissues, salivary glands, and heads of *Aedes aegypti* when incubated at higher temperatures (28°C and 34 °C). Viruses were detected 10 dpi in salivary glands and head tissues. Virus titers in salivary gland were much higher at 34°C than 28°C, and had no significant differences at 20 dpi. Virus titers in body tissues did not change significant during 0 to 15 days at 16°C and had few virus particles in salivary gland during 10-15 dpi. Virus titers in body tissues was declining during 5 to 10 dpi at 10°C, but no virus were detected in salivary gland. The virus titers in head tissues had no significant differences between 22°C, 28°C and 34°C. There was only one mosquito head had few virus detection at 16°C, and no virus was detected at 10 °C.

Key words: *Aedes aegypti*, Dengue virus, Temperature, Taiwan

一、前言

在台灣，埃及斑蚊以及白線斑蚊是傳播登革病毒的主要病媒蚊。前者局部分布於台南、高雄、屏東、台東市及澎湖縣馬公市及望安鄉，主導每年南部登革熱的流行，而白線斑蚊分布於全島，造成北部及中部的登革熱群聚病例發生。截至目前為止，除 1990 年外，每年登革熱的發生皆由境外移入多株的病毒開始，傳給當地的病媒蚊，造成流行，到冬天溫度偏低後，則流行終止。由 2010 年至 2012 年的大規模誘蚊產卵器的調查發現高雄地區埃及斑蚊可終年吸血產卵，但為何 2 月至 3 月無本土病例發生？目前全球氣候逐漸升高 (Hansen 2006, Hansen 2006)，對於病媒蚊的擴散與病毒的傳播提供較有利的環境，所以隨著溫度的變化，埃及斑蚊有可能會北移。希望藉此計畫釐清溫度對登革病毒在台灣病媒蚊的外在潛伏期的狀況，探討登革病毒在台灣本土化的可能，以瞭解登革病毒不越冬的可能原因，提供病媒蚊防治政策之參考。

登革病毒屬於黃熱病毒屬(*Flaviviridae*)、登革病毒亞屬(Dengue virus)，為一節肢動物媒介病毒(arbovirus)，是引起登革熱的病原體。依其抗原性不同，分別有 DEN-1, 2, 3, 4 四種血清型別。登革熱在台灣沉寂 40 年後，再度於 1988 年在南部爆發，每隔 3 年有一次小流行，10 年一次大流行，直至 2004 年後，每年發生流行，病例數在 202-2000 間。流行的時間為 6-12 月，高峰可能發生在 9-11 月(圖一)。登革熱主要流行於南部地區，包括台南市、

高雄市及屏東縣(圖二)，且常有多種型別同時流行的趨勢。每年初夏，登革病毒都由旅遊者自疫區帶入登革病毒，傳給本地的病媒蚊，造成本土流行，但常常到乾冷的冬天則流行循環終止(Kuan et al. 2010, Lin et al. 2010)。在南部地區乾季發生在 10 月至 4 月，而濕季發生在 5 月至 9 月。然而在 1987-1988 年及 2001-2002 年，登革病毒越冬，並造成隔年大流行(Chang et al. 2012)。在 2010 年 6 月至 2011 年 6 月，以誘蚊產卵器所進行的調查亦發現埃及斑蚊在高雄市可終年吸血產卵(Wu et al. 2013)。所以不同型別的登革病毒在不同溫度下，在台灣病媒蚊體內的繁殖與複製值得進一步探討。

處在熱帶地區的東南亞國家(例如泰國)，終年都有病例發生，流行季節開始於乾季快結束時，而在雨季到達高峰。泰國研究人員認為，疫情的多寡可能與季節溫度的改變有關(Carrington et al. 2013)。而後有研究顯示，在 20 年的流行病學資料調查中發現，溫度的改變會影響埃及斑蚊感染登革病毒的感受性(Watts et al. 1987)。除了流行病學的調查外，有論文指出溫度的變化會影響病毒的複製(Barbazan et al. 2010, Halstead et al. 2008)。一般來說，在較高的溫度下，病毒的複製與傳播速度都會比較快。溫度對於病媒蚊的生長、移動，已經跟病毒間的作用都有所影響，而季節的變化更是會影響病媒蚊的數量。此外，成蚊所處的環境亦會影響病毒的感受性。在實驗室的研究發現，在 10°C 的環境下病媒蚊即可感染病毒，在 13°C 的環境下就

可傳播病毒(Richardson et al. 2011, Turell et al. 1990)。此外，溫度也可影響病媒蚊的生長及感染，當溫度在 30°C 時，埃及斑蚊的死亡率就會開始增加，而一旦溫度高於 35°C 時，病媒蚊的病毒感染率就會下降(Tun-Lin et al. 2000, Watts et al. 1987)。先前的研究發現，當外界溫度較高時，病媒蚊對於 Eastern equine encephalitis virus、西尼羅病毒、Saint Louis encephalitis virus 等病毒皆有較好的感受性(Chamberlain et al. 1955, Kilpatrick et al. 2008, Richards et al. 2009)。在較低溫的環境中飼養幼蟲，亦會影響病毒感染病媒蚊的效率，於 2011 年的兩篇研究指出以 Sindbis virus 不同溫度飼養的幼蟲，在 30°C 成長的幼蟲感染效果會比在 20°C 成長的幼蟲來得好(Muturi et al. 2011, Muturi et al. 2011)。

一般而言，當病媒蚊吸血後，病原會先在雌蚊體內穿過中腸，在腸道內組織進行病毒複製，之後病毒會移至唾腺而開始具有傳播能力，這個過程稱為 extrinsic incubation period (EIP)，登革熱的 EIP 期間皆約需 2 週。先前研究發現，不同的溫度會影響 EIP 的時間，有研究人員以登革病毒感染病媒蚊後，分別飼養於 26、28、30°C 的環境中，其結果發現在 28 與 30°C 的環境中，於感染後五天即可偵測到病毒存在，而飼養於 26°C 的環境中，則需 9 天才能測到病毒(Rohani et al. 2009)。另一方面，在病毒的傳播中，病媒蚊的生長與發育也會影響病毒複製。有研究人員認為，蚊子所處的環境在病毒與宿主

的互動上扮演重要的角色，且會影響感染的強度與傳播的速度。此外，病媒蚊幼蟲生長的環境也會影響成蚊的體型大小，這也是決定登革病毒複製速度的因子之一(Alto et al. 2008, Dye et al. 1986)。

二、材料與方法

(一)蚊蟲採集及飼養

由野外採集埃及斑蚊，帶回實驗室飼養，若為幼蟲，以足量的酵母粉放置於 W40.5×D29.5×H7.5 水盤飼，幼蟲化蛹後，檢出放置於蚊蟲飼養箱，將調製好 10% 糖水於燒瓶內，上面放置棉花棒後，放入成蚊飼養箱內，作為雌蚊及雄蚊的食物，定期吸食老鼠血，收集第一代卵粒。第一代卵以足量的酵母粉放置於 W40.5×D29.5×H7.5 水盤飼，幼蟲化蛹後，檢出放置於蚊蟲飼養箱，將調製好 10% 糖水於燒瓶內，上面放置棉花棒後，放入成蚊飼養箱內，留待後面實驗室用。

(二)感染試驗

- 1.將 2-5 日齡埃及斑蚊雌蚊 10 隻，放置於紙杯，(紙杯上裝置紗網，橡皮圈先固定後，再以膠帶密封，紙杯中間作一活動開口)，活動開口以膠帶密封，放在養蚊籠內，培養箱溫度設定為 10°C、16°C、22°C、28°C 及 34°C。
- 2.禁食 1 天後，將登革病毒、無登革病毒抗體之人血及糖水 1:1 混合均勻，使用 Hemotek 5W1 membrane feeding system 儀器，供蚊蟲吸血 1 小時，於網上

放入吸水棉花，每隔 2 日更換一次，並觀察記錄蚊蟲存活隻數。處理時間包括吸血後 0 日、5 日、10 日、15 日、20 日、25 日、30 日。

3. 按照處理時間取出，觀察紀錄蚊蟲存活隻數，將蚊蟲放入 -20°C 凍死後，將蚊蟲區分為頭部、唾液腺、及身體(包含胸部與腹部)，放入 -20°C 的冷凍箱內保存，以作後續登革病毒檢驗。

4. 共進行 1 種病毒血清型別(第一型)感染，每次均進行對照組。

(二)病媒蚊體內病毒 RNA 的萃取方法

1. 將單隻蚊子放入 1.5ml 微量試管中，加入 0.5mL BA-1 溶液，並放入 1 顆滅菌過的 3mm 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 1.5ml 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°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 QIAampspin column(放置於 2 mL collection tube 上)，蓋上蓋子，以 14000rpm 轉速離心 2 分鐘，將 QIAampspin column 放置新的 2 mL collection tube 上。
10. 小心打開 QIAampspin column 的蓋子，加入 500 μ l AW1 溶液，蓋上蓋子，以 14,000rpm 轉速離心 2 分鐘，將 QIAampspin column 放置新的 2mL collection tube 上。
12. 小心打開 QIAampspin column 的蓋子，加入 500 μ l AW 2 溶液，蓋上蓋子，以 14,000rpm 轉速離心 2 分鐘，倒去下層液。
13. 將 QIAampspin column 放置新的 1.5ml 微量離心管上，以 14,000rpm 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。
14. 將 QIAampspin 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。

15. 抽出病毒 RNA 後隨即進行 one-step QRT-PCR 偵測病毒量。

(三) 病毒絕對定量

1. 取已知校價的病毒進行 10x 的序列稀釋，以建立標準曲線。

2. 以 QuantiTect SYBR green RT-PCR kit 試劑組進行反應。

3. 將待測檢體與已知校價的病毒依操作手冊建議，配製 one-step RT-PCR solution。

4. 待配製好後，放入 LightCycler480II 進行分析。

5. PCR 反應條件為 50°C/30 min, 95°C/15 min, (94°C/15 sec, 55°C/30 sec, 72°C/20 sec) 重複 45 cycle. 95°C /1 sec 往下降至 60°C。

三、結果

(一) 蚊蟲採集

配合野外蚊蟲出現時機，於今年四月，至高雄市前鎮區採集埃及斑蚊幼蟲及蛹 90 隻左右，在實驗室進行飼養，吸血，收集所產之第一代卵粒。

(二) 標準曲線

首先建立去年在台灣出現的第一型登革病毒株的病毒量化曲線。用已知病毒量(1.63×10^7 PFU/ml)的病毒液進行 10 倍的序列稀釋，建立了三組病毒量化標準曲線，分別是病毒加頭部組織(圖三 A)，病毒加唾腺組織(圖三 B)，以及病毒加身體組織(圖三 C)，作為日後病毒感染試驗的計量基準。此

三個病毒量化標準曲線的 R^2 值為 0.9984、0.9985 及 0.9985。

(三)病毒感染試驗

將 2-5 日齡埃及斑蚊雌蚊 70-80 隻放在養蚊籠內，禁食 1 天後，將登革病毒、無登革病毒抗體之新鮮人血及糖水 1:1 混合均勻，使用 Hemotek 5W1 membrane feeding system 儀器，供蚊蟲吸血 1 小時。之後將埃及斑蚊 10 隻為一組，放置於紙杯並於網上放入滴糖水的棉花，之後所有紙杯放在養蚊籠內，放進培養箱。實驗溫度分別為 10°C、16°C、22°C、28°C、34°C。並於感染後 0 日、5 日、10 日、15 日、20 日、25 日、30 日逐一收蚊子檢體，並將蚊蟲解剖分為頭部、唾液腺、及身體(包含胸部與腹部)，抽其病毒 RNA，進行 one-step QRT-PCR。在培養溫度為 10°C 的環境，埃及斑蚊在感染後第 10 天的存活率為 40%，到了感染後第 15 天存活率為 0。在 16°C 的培養環境埃及斑蚊存活率稍微提升，在感染後 15 天有 50% 的存活率，但在感染後 20 天存活率為 0。隨著培養溫度提高埃及斑蚊的存活率也跟著上升，在 22°C 的培養環境中埃及斑蚊在感染後第 15 天有 60% 的存活率，到了感染後第 25 天依然有 20% 的存活率，而在感染後第 30 天存活率為 0%。在 28°C 及 34°C 的培養條件下，在感染後第 15 天存活率皆為 80%。在感染後 30 天，其存活率分別為 60% 及 50% (如表一所示)。

在 10°C 的培養環境下僅在感染後第 0、5、10 天的身體組織偵測到病毒，

在感染第 0 天所測到的病毒量應為蚊子所吸食之病毒，其病毒量為 $10^{2.84 \pm 0.41}$ 。感染後第 5 天及第 10 天的病毒 RNA 的 copy 數平均分別為 $10^{2.36 \pm 0.26}$ 、 $10^{2.41 \pm 0.33}$ (圖四 A)。在感染第 10 天之後的蚊子全數死亡。10°C 的培養環境下在唾腺以及頭部組織則未偵測到病毒 (圖四 B 及 C)。

在 16°C 的實驗條件顯示感染後 15 天依然可以偵測到病毒。在感染後第 0 天身體組織偵測到的病毒 RNA 數為 $10^{2.86 \pm 0.4}$ 。感染後第 5、10、15 天，病毒 RNA 的 copy 數平均分別為 $10^{2.73 \pm 0.2}$ 、 $10^{2.81 \pm 0.41}$ 、 $10^{2.93 \pm 0.43}$ (圖五 A)。在唾腺組織的部分，於感染後第 10、15 天發現僅有一隻埃及斑蚊可偵測到病毒，其病毒 RNA 數分別為 $10^{1.54}$ 、 $10^{1.82}$ (圖五 B)。而頭部組織僅有在感染後第 15 天於一隻埃及斑蚊偵測到病毒，病毒 RNA 數為 $10^{1.95}$ (圖五 C)。

當溫度升至 22°C 時，埃及斑蚊存活率與所偵測到的病毒量都有增加的趨勢。在感染第 0 天於身體組織偵測到的病毒量為 $10^{2.7 \pm 0.56}$ ，感染後第 5-15 天病毒量隨著感染天數增加而上升，在感染後第 15 天病毒量出現高峰，此三個時間點所偵測到的病毒量分別為 $10^{2.8 \pm 0.53}$ 、 $10^{3.21 \pm 0.7}$ 、 $10^{3.49 \pm 0.47}$ (圖六 A)。到了感染後 20、25 天身體組織的病毒量稍微下降，病毒 RNA copy 數分別為 $10^{3.01 \pm 0.15}$ 、 $10^{3.25}$ 。在此溫度下，感染第 10 天後有兩隻埃及斑蚊可在唾腺組織偵測到病毒，病毒量為 $10^{2.09 \pm 0.08}$ ，感染後第 15 天病毒量增加並達到高峰，病毒 RNA 數為 $10^{2.69 \pm 0.43}$ ，感染後 20、25 天病毒 RNA copy 數分別為 $10^{2.54 \pm 0.31}$ 、

$10^{2.38}$ (圖六 B)。頭部組織亦可於 10 天後偵測到病毒，25 天後病毒下降(圖六 C)。

在 28°C 的培養環境下，感染後第 0 天的蚊子身體組織可測到病毒量(圖七 A)。在感染後第 5 天，其病毒 RNA 的 copy 數平均為 $10^{3.2\pm 0.53}$ 。在感染後 15 天病毒量出現高點，其病毒量為 $10^{4.05\pm 0.86}$ ，而到了感染後 20、25、30 天偵測到的病毒 RNA copy 數些微下降，其值分別為 $10^{3.81\pm 0.66}$ 、 $10^{3.70\pm 0.63}$ 、 $10^{3.66\pm 0.6}$ 。唾腺組織在感染後第 10 天於部份蚊蟲偵測到病毒，在感染後 10 天-25 天隨著感染時間增加，唾腺組織偵測到的病毒量也增加，在感染後 10、15 天，偵測到的病毒 RNA copy 數分別為 $10^{2.67\pm 0.33}$ 、 $10^{3.38\pm 0.49}$ (圖七 B)。在感染後 20 日病毒量持續上升，病毒 RNA copy 數為 $10^{3.81\pm 0.82}$ ，到了感染後 25、30 日病毒量變化不大，其數值分別為 $10^{3.68\pm 0.77}$ 、 3.89 ± 0.58 。頭部組織亦是在感染後第 10 天，於兩隻蚊子檢體偵測到病毒，病毒 RNA copy 數為 $10^{2.17\pm 0.13}$ (圖七 C)。在感染後 15~25 天病毒量有些微上升，但變化量不大。於感染後 10、15、25、30 天所偵測到的病毒 RNA copy 數分別為 $10^{2.47\pm 0.44}$ 、 $10^{2.44\pm 0.31}$ 、 $10^{2.44\pm 0.45}$ 、 $10^{2.35\pm 0.43}$ 。

在 34°C 的實驗環境下，登革病毒複製的速度以及數量都有明顯增加的現象。感染第 0 天在身體組織可以偵測到病毒 RNA 的 copy 數平均為 $10^{2.72\pm 0.44}$ (圖八 A)。感染後第 5-15 天病毒量隨著感染天數增加而上升，在感染後第

15 天病毒量出現高峰，此三個時間點所偵測到的病毒量分別為 $10^{3.38\pm0.58}$ 、 $10^{3.66\pm0.54}$ 、 $10^{4.09\pm0.71}$ 。感染後第 20-30 天，病毒 RNA 數有些許下降，但是變化量不大。感染後 20、25、30 天所偵測到的病毒 RNA copy 數分別為 $10^{3.96\pm0.4}$ 、 $10^{3.75\pm0.58}$ 、 $10^{3.83\pm0.35}$ 。唾腺組織在感染後第 10 天於可偵測到病毒，病毒 RNA copy 數為 $10^{2.96\pm0.52}$ ，在感染後第 15 天病毒量增加，感染後第 15-30 天病毒變化量差異不大，其病毒 RNA copy 數分別為 $10^{3.64\pm0.37}$ 、 $10^{3.76\pm0.41}$ 、 $10^{3.65\pm0.44}$ 、 $10^{3.8\pm0.26}$ (圖八 B)。頭部組織也是在感染後第 10 天，於 3 隻埃及斑蚊檢體偵測到病毒，病毒 RNA copy 平均數為 $10^{2.46\pm0.11}$ (圖八 C)。在感染後 15-30 天病毒量變化量不大，但在感染後 30 天病毒量有稍微下降。於感染後 15、25 天所偵測到的病毒 RNA copy 數分別為 $10^{2.54\pm0.35}$ 、 $10^{2.56\pm0.31}$ 、 $10^{2.56\pm0.37}$ 、 $10^{2.3\pm0.3}$ 。

四、討論

本計畫將登革病毒第一型感染野外埃及斑蚊後，放置於不同的溫度環境下，進行身體組織、唾液組織及頭部組織進行登革病毒病毒量檢測。發現在 10°C 環境下，病毒不會複製，也不會移動至頭部或唾液腺，在 16°C 環境下，病毒複製現象不明顯，少量蚊蟲病毒在 10 天內會移動至頭部或唾液腺，在 $22-34^{\circ}\text{C}$ 環境下，病毒複製明顯，15 天為高峰，且 10 天內會移動至頭部或唾腺。

本計畫得到的結果(10°C 不會傳播， $16-34^{\circ}\text{C}$ 會傳播)與早期的研究結果相似。埃及斑蚊恆溫傳播臨界溫度分別為 13°C (M cLean et al. 1975)及

35°C(Watts et al. 1987, Carrington et al. 2013a)。最近有研究模擬野外變溫可縮短外在潛伏期 (Carrington et al 2013 ab, Lambrechts et al. 2011)。

我們分別比較身體、唾腺、頭部組織在不同溫度下登革病毒複製的速度，發現身體組織的病毒量在 28°C 以及 34°C 的培養環境差異不大，但與 22°C 的培養環境下的身體組織相比，則可發現病毒複製量有減少的趨勢。在 16°C 的培養溫度結果顯示，在病毒感染後第 0 天到第 15 天，病毒變化量差異不大。在 10°C 培養條件結果則顯示在病毒感染後，身體組織的病毒量甚至有下降的趨勢。在身體組織可以發現病毒 RNA 持續存在，這代表病毒可持續感染蚊蟲的腸道細胞，而先前研究亦發現登革病毒感染人類細胞株，亦會有持續感染的現象(Kurane 1990)。

在唾腺組織則可發現溫度對病毒的移動速度有較明顯的差異，比較唾腺組織在 28°C 以及 34°C 的培養條件則可發現，在感染後第 10 天於 34°C 培養的埃及斑蚊其唾腺組織有較高的病毒量，且在感染後第 15 天的病毒量依然較高，直到感染後 20 天兩者的病毒量相近並持續到感染後 30 天。在 22°C 及 16°C 的溫度下，埃及斑蚊的唾腺組織依然可以偵測到病毒但其病毒量低。在 22°C 的環境，唾腺組織的病毒量在感染後第 15 天呈現下降的趨勢，在 16°C 的環境僅在一隻埃及斑蚊的唾腺組織偵測到病毒，且在感染後第 15

天其病毒量未超過 10^2 。在 10°C 的環境下則是未在埃及斑蚊的唾腺組織偵測到病毒。病媒蚊感染病毒後，病毒在雌蚊體內穿過中腸，而後進行病毒複製，之後病毒會移至唾腺而開始具有傳播能力，這個過程稱為 EIP。從實驗中發現，在較高溫的環境中其 EIP 所需的時間較短，而且唾腺組織的病毒量也比較高，且病毒也會持續存在。當 EIP 所需的時間越短，代表病媒蚊傳播病毒的速度越快。一般在自然環境中 EIP 所需的時間為 7-12 天(Watts 1987)，飼養於 28°C 及 34°C 的病媒蚊能在感染後第 10 天即偵測到高量的病毒，這也表示此埃及斑蚊在傳播登革病毒給人類的速度也將會提高。

在 28°C 以及 34°C 的培養條件下，埃及斑蚊頭部組織所偵測到的病毒量差異不大，與 22°C 培養的埃及斑蚊頭部組織相比，病毒量呈現略少的趨勢。在 16°C 的飼養環境下，僅有一隻埃及斑蚊有偵測到少量病毒，在 10°C 的環境則是在頭部組織未偵測到病毒。

五、結論與建議

一、埃及斑蚊感染第一型登革病毒後，在 22°C 以上的環境登革病毒均有明顯複製， 16°C 維持， 10°C 病毒量降低，10 天後除 10°C 外，均可在唾液腺發現。建議進行模擬野外變溫模此研究發現埃及斑蚊感染第一型登革病毒後，10 天後除 10°C 外，均可在唾液腺發現，全球暖化，造成溫度及雨量的改變，可能使得埃及斑蚊往台灣其他地區移動及登革病毒越冬，因此應有預防計畫降低埃及斑蚊密度，防止埃及斑蚊擴散，並登革病毒本土化。

二、全球暖化，造成溫度及雨量的改變，可能使得埃及斑蚊往台灣其他地區移動及登革病毒越冬，因此應有預防計畫降低埃及斑蚊密度，防止埃及斑蚊擴散，並登革病毒本土化。

六、重要研究成果及具體建議

此研究發現埃及斑蚊感染第一型登革病毒後，10 天後除 10°C 外，均可在唾液腺發現，全球暖化，造成溫度及雨量的改變，可能使得埃及斑蚊往台灣其他地區移動及登革病毒越冬，因此應有預防計畫降低埃及斑蚊密度，防止埃及斑蚊擴散，並登革病毒本土化。

七、參考文獻

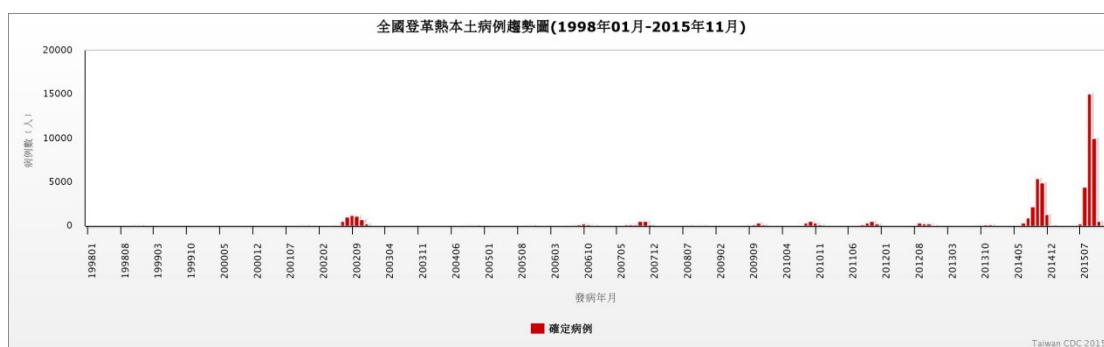
- Alto BW, Reiskind MH, Lounibos LP. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2008;79:688-695.
- Barbazan P, Guiserix M, Boonyuan W, Tuntaprasart W, Pontier D, Gonzalez JP. Modelling the effect of temperature on transmission of dengue. *Medical and veterinary entomology* 2010;24:66-73.
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW. Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits. *PLoS One* 2013a; 8:e58824.
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Scott TW. Fluctuations at low mean temperatures accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013b;7: e2190.

- Carrington LB, Seifert SN, Armijos MV, Lambrechts L, Scott TW. Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2013c;88:689-697.
- Chamberlain RW, Sudia WD. The effects of temperature upon the extrinsic incubation of eastern equine encephalitis in mosquitoes. *American journal of hygiene* 1955;62:295-305.
- Chang SF, Huang JH, Shu PY. Characteristics of dengue epidemics in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2012;111:297-299.
- Dye C. Vectorial capacity: must we measure all its components? *Parasitology today* 1986;2:203-209.
- Epstein PR. Climate change and human health. *The New England journal of medicine* 2005;353:1433-1436
- Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annual review of entomology* 2008;53:273-291.
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:14288-14293.
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS pathogens* 2008;4:e1000092.
- Kuan MM, Lin T, Chuang JH, Wu HS. Epidemiological trends and the effect of airport fever screening on prevention of domestic dengue fever outbreaks in Taiwan, 1998-2007. *International journal of infectious diseases : IJID :*

- official publication of the International Society for Infectious Diseases
2010;14:e693-697.
- Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. Archives of virology 1990;110:91-101.
- Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB, et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108:7460-7465.
- Lin CC, Huang YH, Shu PY, Wu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Lei HY. Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007. The American journal of tropical medicine and hygiene 2010;82:731-739.
- McLean DM, Miller MA, Grass PN. Dengue virus transmission by mosquitoes incubated at low temperatures. Mosq News 1975; 35:322-7.
- Muturi EJ, Alto BW. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. Vector borne and zoonotic diseases 2011;11:1157-1163.
- Muturi EJ, Lampman R, Costanzo K, Alto BW. Effect of temperature and insecticide stress on life-history traits of *Culex restuans* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology 2011;48:243-250.
- Richards SL, Lord CC, Pesko K, Tabachnick WJ. Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) vector competence for Saint Louis encephalitis virus. The American journal of tropical medicine and hygiene 2009;81:264-272.

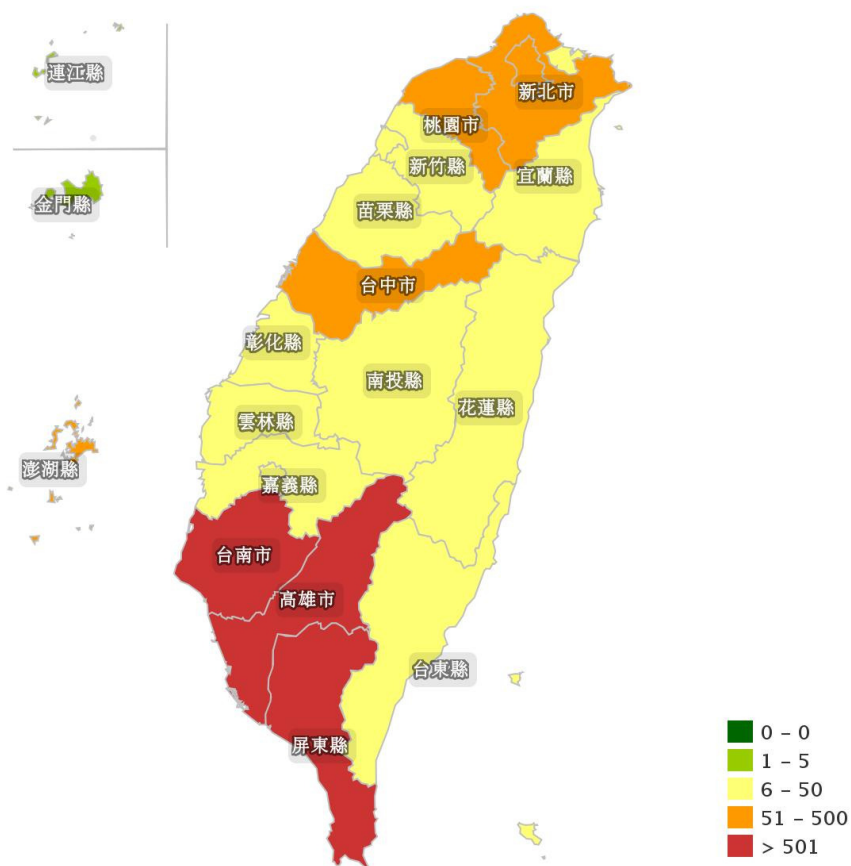
- Richardson K, Hoffmann AA, Johnson P, Ritchie S, Kearney MR. Thermal sensitivity of *Aedes aegypti* from Australia: empirical data and prediction of effects on distribution. *Journal of medical entomology* 2011;48:914-923.
- Rohani A, Wong YC, Zamre I, Lee HL, Zurainee MN. The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti* (L.). *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 2009;40:942-950.
- Tun-Lin W, Burkot TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical and veterinary entomology* 2000;14:31-37.
- Turell MJ, Lundstrom JO. Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes aegypti* and *Ae. taeniorhynchus* for Ockelbo virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1990;43:543-550.
- Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1987;36:143-152.
- Wu HH, Wang CY, Teng HJ, Lin C, Lu LC, Jian SW, Chang NT, Wen TH, Wu JW, Liu DP et al. A dengue vector surveillance by human population-stratified ovitrap survey for *Aedes* (Diptera: Culicidae) adult and egg collections in high dengue-risk areas of Taiwan. *Journal of medical entomology* 2013;50:261-269.

八、圖表

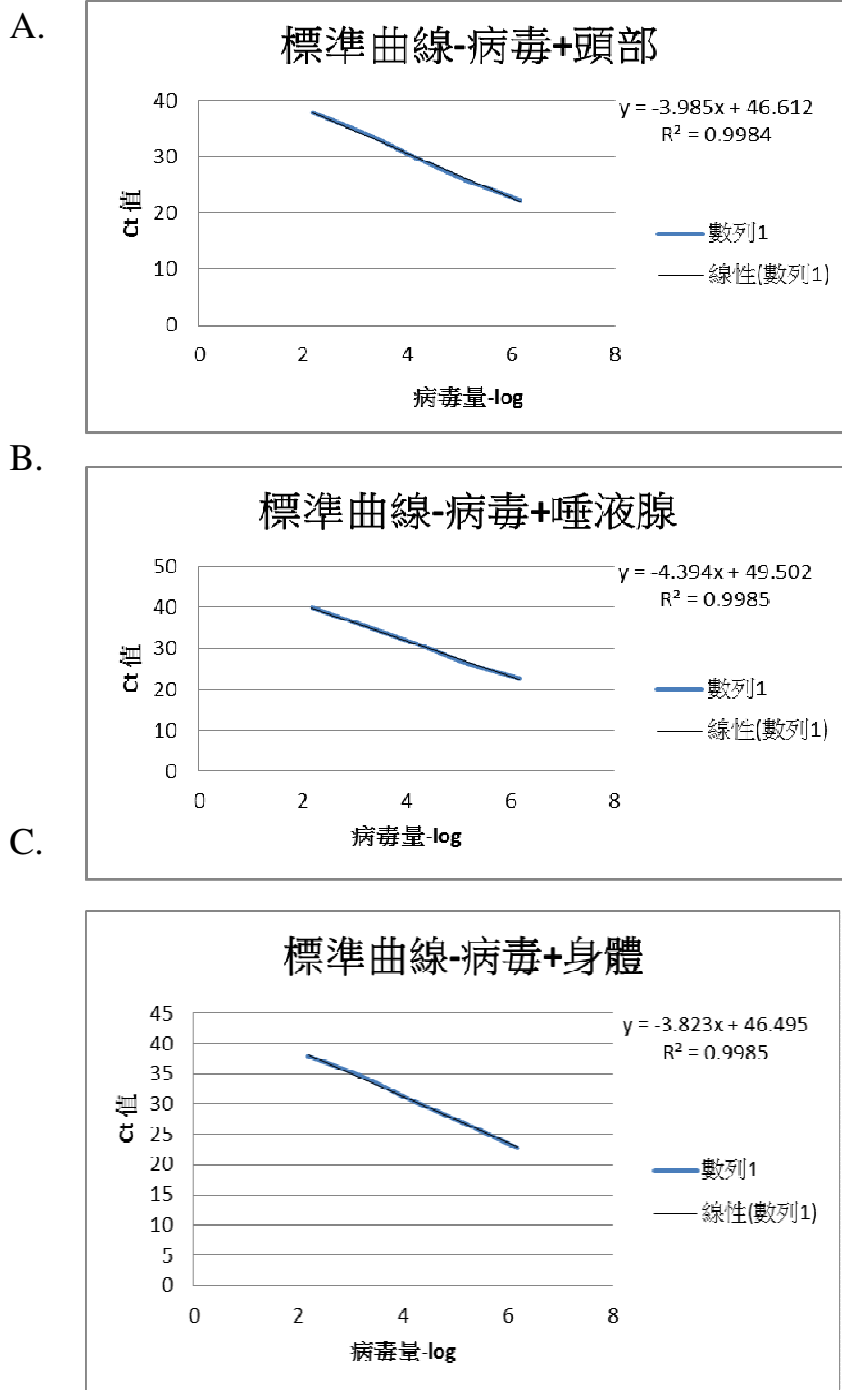


圖一、87年至104年台灣地區登革熱本土病例趨勢圖。

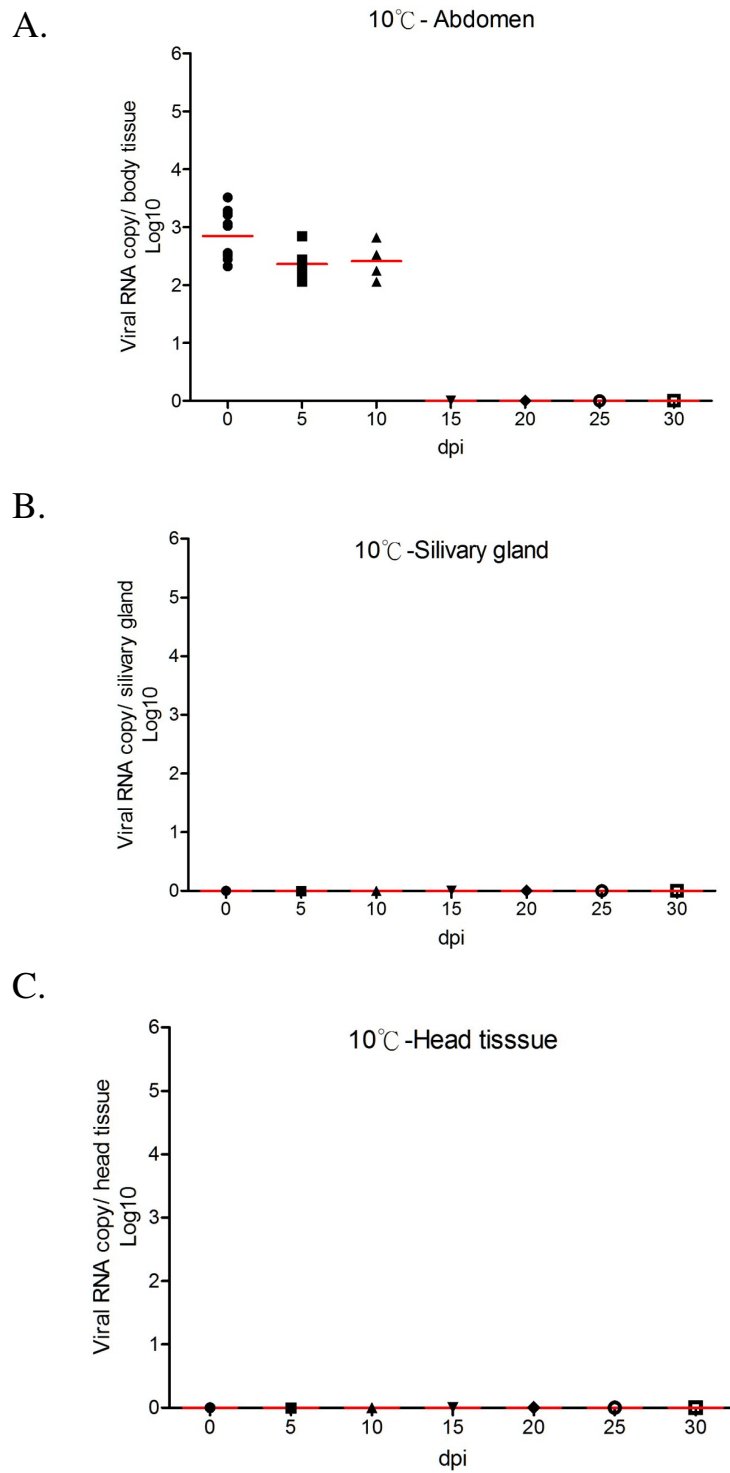
全國登革熱本土病例地理分佈(1998年01週-2015年44週)



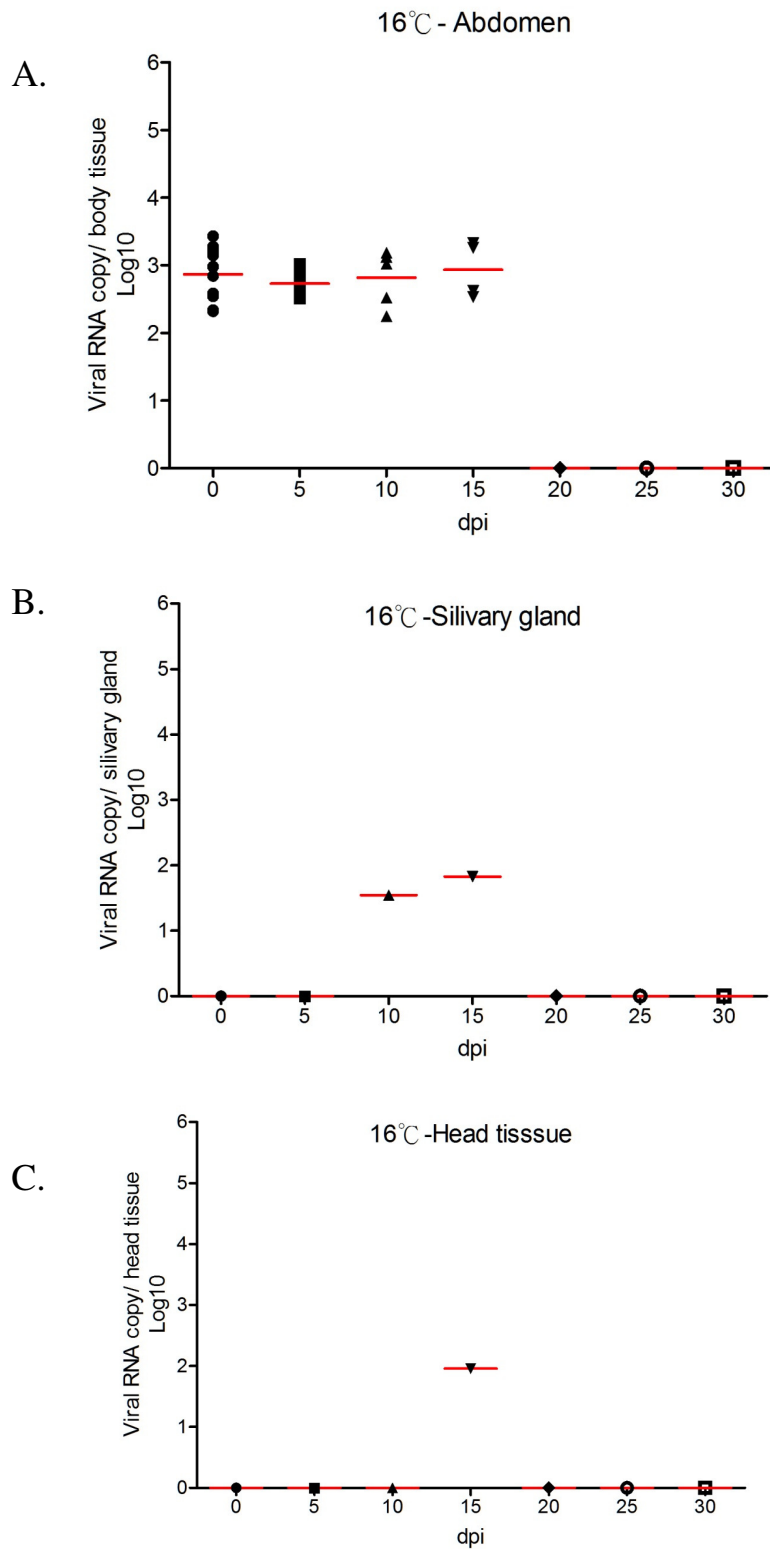
圖二、87年至104年台灣地區登革熱本土病例分布圖。



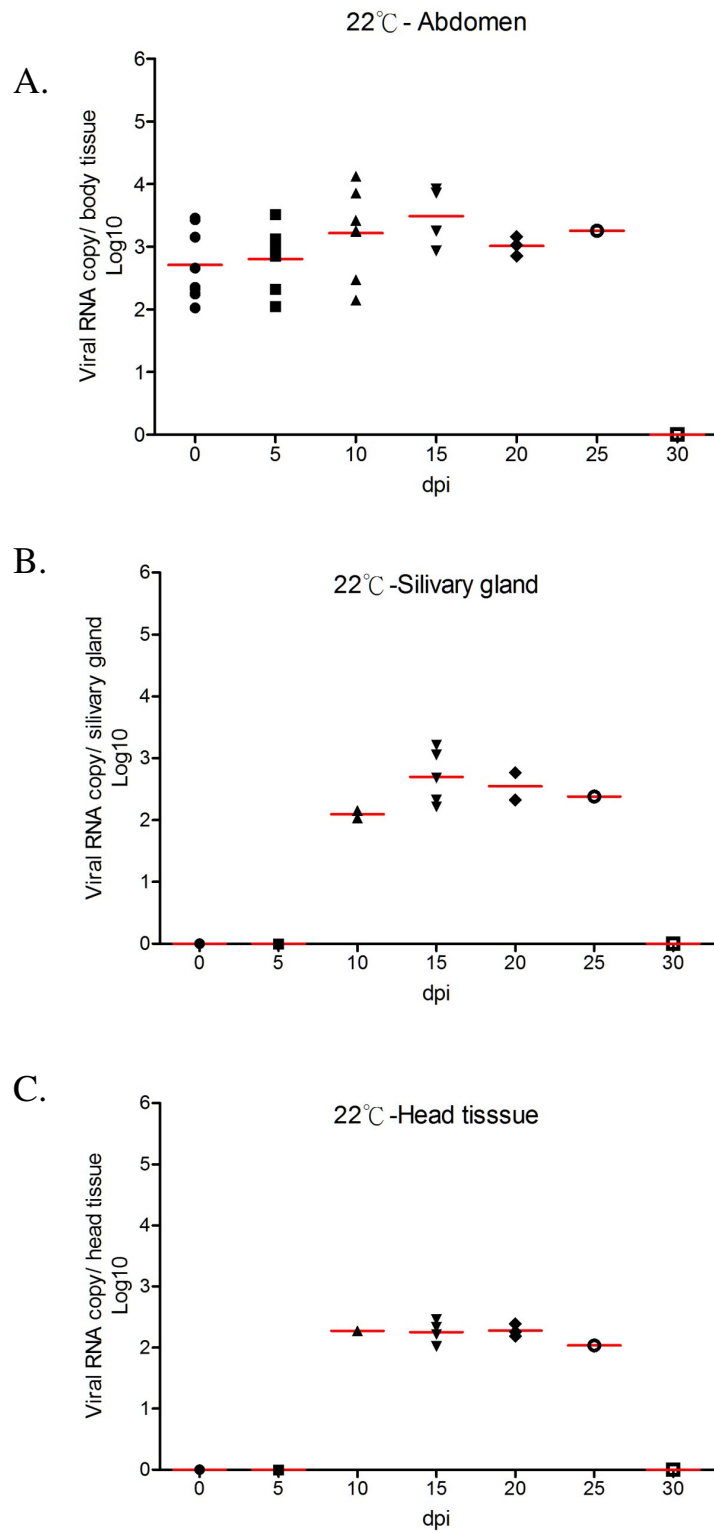
圖三、病毒液序列稀釋再加上頭部組織(A)、病毒液序列稀釋再加上蚊子唾液組織(B)及病毒液序列稀釋再加上身體組織之標準曲線圖。



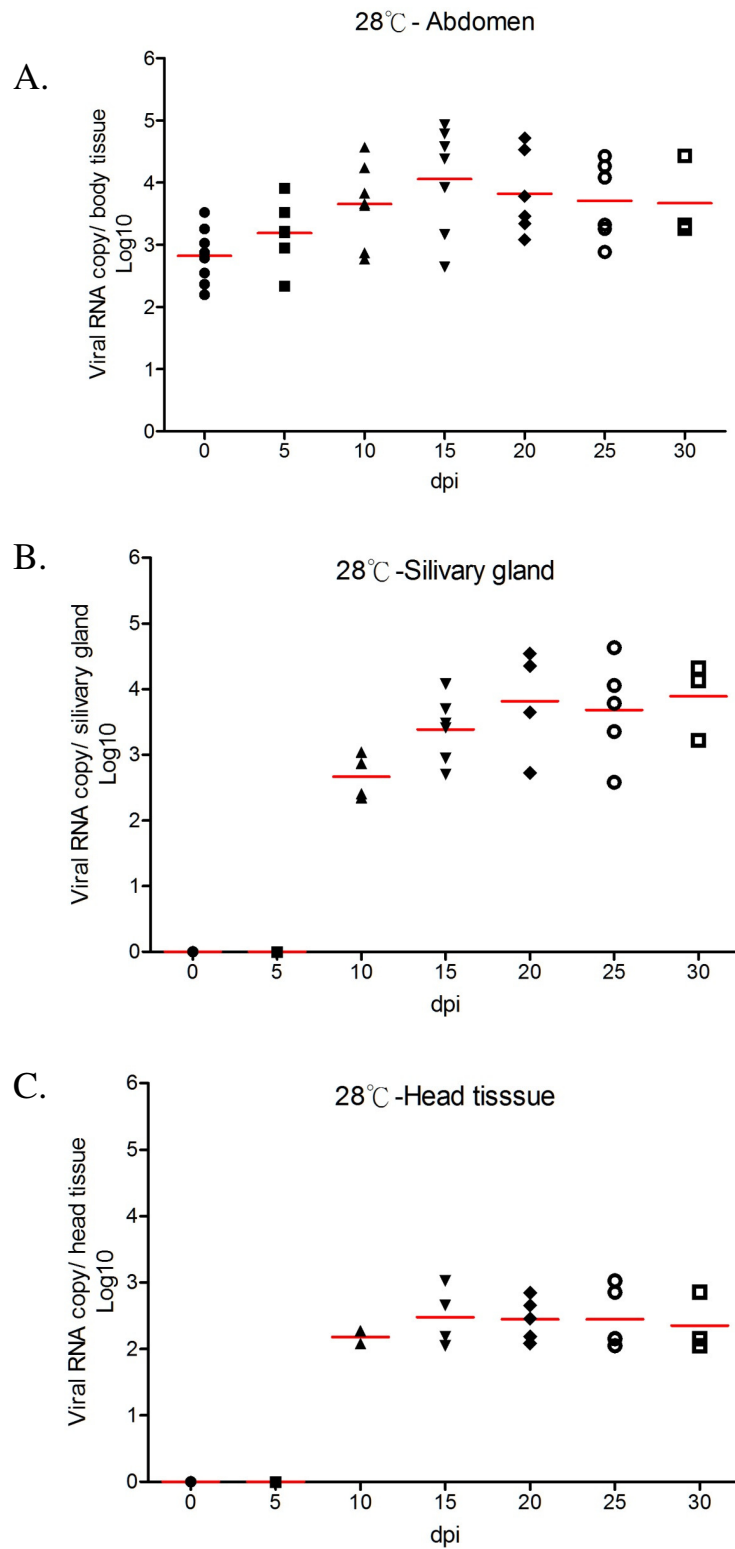
圖四、蚊子感染登革病毒第一型後，在 10°C 環境下，身體組織、唾液組織及頭部病毒量的時間變化(A)。



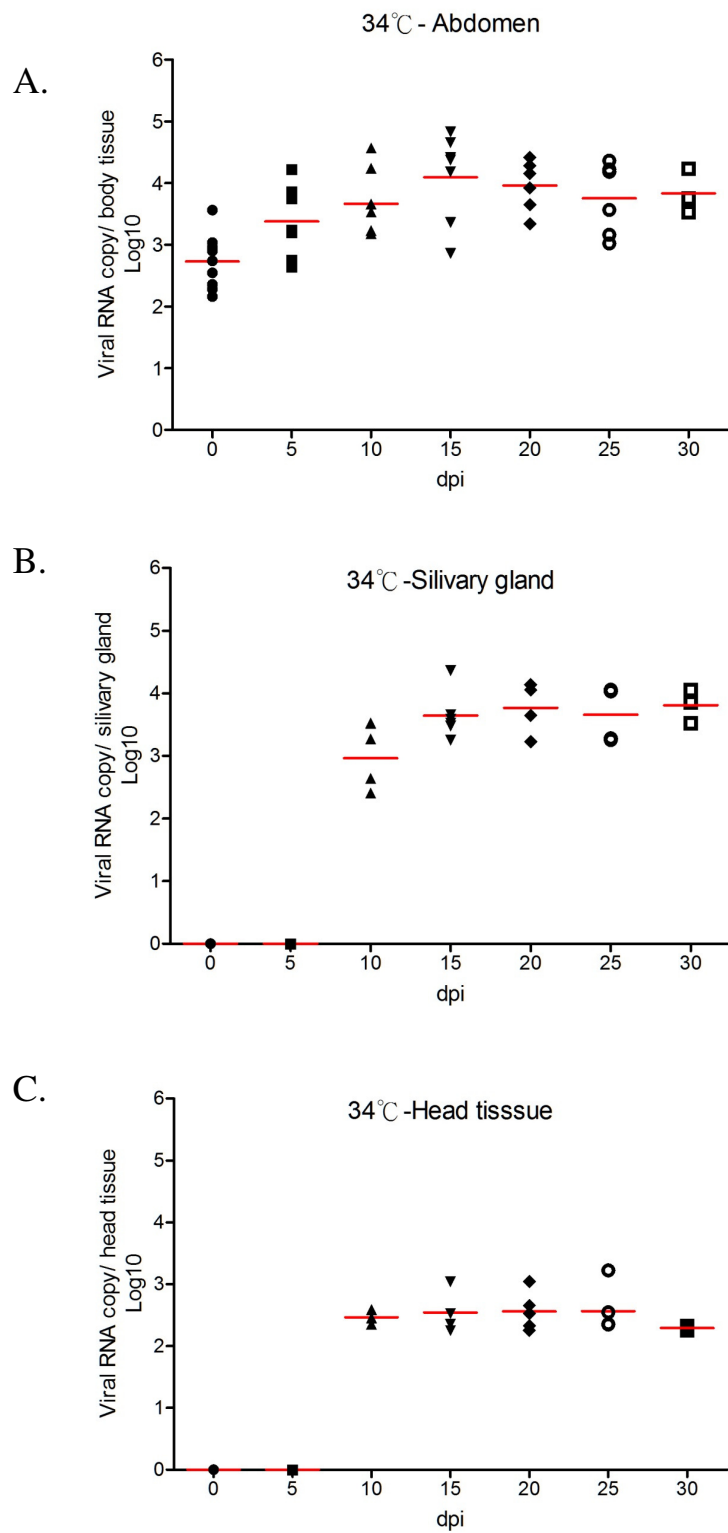
圖五、蚊子感染登革病毒第一型後，在 16°C 環境下，身體組織、唾液組織及頭部病毒量的時間變化(A)。



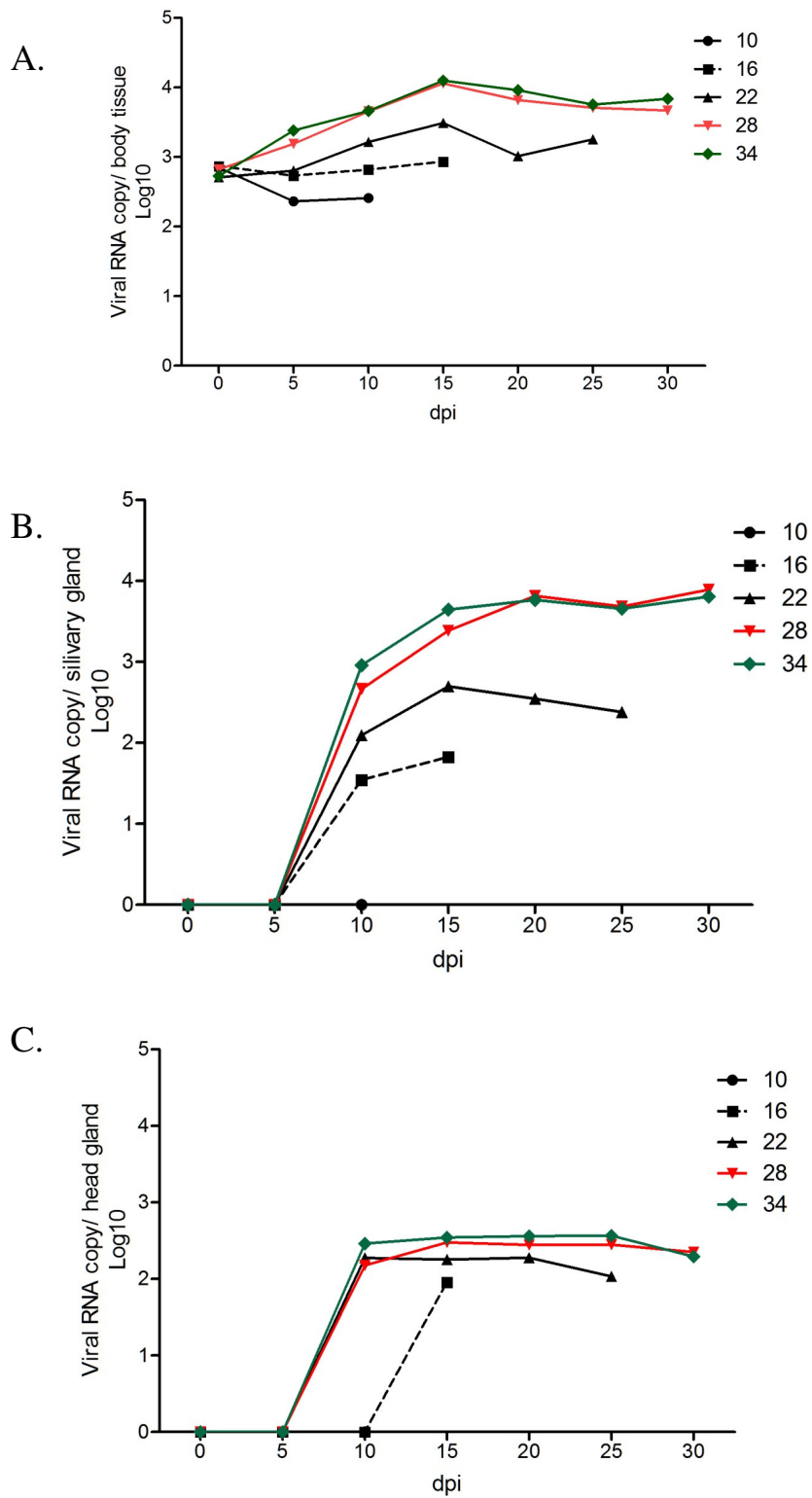
圖六、蚊子感染登革病毒第一型後，在 22°C 環境下，身體組織、唾液組織及頭部病毒量的時間變化(A)。



圖七、蚊子感染登革病毒第一型後，在 28°C 環境下，身體組織、唾液組織及頭部病毒量的時間變化(A)。



圖八、蚊子感染登革病毒第一型後，在 34°C 環境下，身體組織、唾液組織及頭部病毒量的時間變化(A)。



圖九、不同溫度下(10-34°C)，身體組織(A)、唾液組織(B)及頭部組織(C)登革病毒複製的速度。

表一、感染登革病毒第一型後，在不同溫度環下埃及斑蚊的存活率。

感染天數	10°C	16°C	22°C	28°C	34°C
0 天	100%	100%	100%	100%	100%
5 天	60%	70%	80%	80%	80%
10 天	40%	60%	80%	80%	80%
15 天	0%	50%	60%	80%	80%
20 天	0%	0%	40%	80%	70%
25 天	0%	0%	20%	70%	70%
30 天	0%	0%	0%	60%	50%