

出國報告（出國類別：研習）

澳大利亞西部新興病媒蚊傳染病檢驗與監測

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：簡淑婉 助理研究員

派赴國家：澳大利亞

出國期間：民國 98 年 11 月 2 日至 12 月 18 日

報告日期：民國 98 年 12 月 21 日

摘要

至科廷科技大學 (Curtin University of Technology) 及西澳大學 (University of Western Australia) 研習節肢動物媒介病毒監測與檢驗，使用技術包括用細胞培養方式檢測病媒蚊是否攜帶病毒，哨兵雞監測Murray Valley Encephalitis Virus或Kunjin Virus血清陽轉情形，另包括酵素免疫分析法(ELISA)及微量中和試驗 (Microneutralisation test)，以檢測哨兵雞或脊椎動物(如袋鼠)血清陽轉情況。目前仍在研發中的技術為用Mass Tag PCR及Multiplex Tandem RT-PCR，以檢測監控西澳地區節肢動物媒介病毒之病媒蚊或臨床檢體，包括Murray Valley Encephalitis Virus, Kunjin Virus, Ross River Virus...等。另有使用FTA[®]卡監測病媒蚊攜帶節肢動物病毒的現況，具效率並可減輕人力，無需將病媒蚊攜帶回實驗室檢測。

目次

- 摘要.....**1**

- 本文.....**3-20**
 - 目的..... 3
 - 過程..... 4-19
 - 心得.....20
 - 建議.....20

目的

此行至西澳大學及科廷科技大學研習之目的為了解西澳地區節肢動物媒介病毒實驗室有關該地區盛行之病媒病毒之檢測及監控，如 Murray Valley Encephalitis Virus, Kunjin Virus, Ross River Virus 等。未來因應新興病媒病毒傳染病，可參考西澳地區監測模式機制與架構，或進一步發展雙邊或多邊合作關係。

過程

- **研習時程**

1. **98年11月3日至98年11月13日，科廷科技大學**

參觀 Dr. David Williams 實驗室，主要為節肢動物媒介病毒實驗室，主要為病毒分子研究及發展 MassTag PCR，並有生物安全等級第三級實驗室及實驗動物實驗室。

2. **98年11月16日至98年12月17日，西澳大學**

參觀節肢動物病毒監測及研究實驗室，該實驗室主要工作為例行性監測節肢動物病毒在西澳地區的活動狀況，及分子流行病學研究。

3. **98年12月16日上午，PathWest**

參觀 PCR 部門及血清學部門，PathWest 為西澳地區臨床病例研究檢驗機構。

● 研習內容

表一：澳洲節肢動物媒介病毒分類及其感染症狀、病媒蚊種、可能宿主及分布區域。

Table 1: Arboviruses associated with human disease in the Australasian zoogeographic region

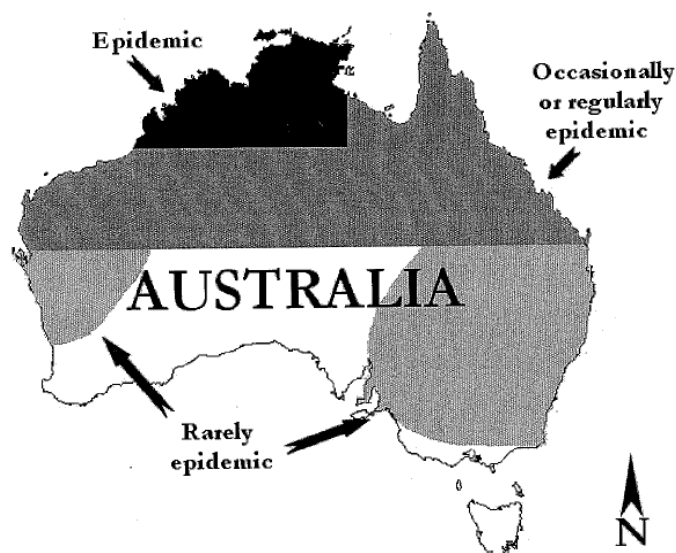
Genus	Virus	Disease syndrome	Major vectors	Suspected hosts	Region/country
<i>Alphavirus</i>	Ross River	Polyarthritits, myalgia, rash, fever, lethargy, malaise	<i>Aedes</i> , <i>Culex</i> mosquitoes	Marsupials (particularly macropods)	Australia, PNG ¹ , Pacific Islands
	Barmah Forest	Polyarthritits, myalgia, rash, fever, lethargy, malaise	<i>Aedes</i> , <i>Culex</i> mosquitoes	Unknown, possibly marsupials	Mainland Australia
	Sindbis <i>SINV</i>	Rash, fever, malaise	<i>Cx. annulirostris</i>	Birds	Throughout Australasia ^{Endemic in the Kimberley}
<i>Flavivirus</i>	Murray Valley encephalitis	Encephalitis	<i>Cx. annulirostris</i>	Water birds	Northern Australia, occasionally south-eastern Australia (<i>Pilbara/Gascoyne, Meikikson</i>)
	Kanjin	Encephalitis, polyarthritits	<i>Culex</i> mosquitoes	Water birds	Northern Australia, occasionally south-eastern Australia
	Dengue (serotypes 1-4)	Fever, haemorrhagic fever, shock	<i>Ae. aegypti</i>	Humans	Queensland, PNG, Pacific Islands
	Japanese encephalitis*	Encephalitis	<i>Culex</i> mosquitoes	Waterbirds, pigs	Eastern and southern Asia, PNG, Torres Strait
	Kokobera*	Fever, headache, rash, myalgia, lethargy	Unknown, isolated from several species	Macropods, possibly horses	Australia, PNG
	Alfuy*	Mild polyarthritits (unconfirmed)	Unknown, isolated from several species	Birds	Mainland Australia
	Stratford*	Malaise, fever (unconfirmed)	Unknown, isolated from several species	Unknown	Eastern Australia
	Edge Hill*	Myalgia, arthralgia, fatigue	Unknown, isolated from several species	Possibly wallabies and bandicoots	Mainland Australia
	Sepik*	Febrile illness	Possibly, <i>Mansonia</i> , <i>Ficobia</i> spp.	Unknown	PNG
Unassigned	Gan Gan*	Fever, myalgia, polyarthralgia, rash	Unknown, isolated from several species	Possibly macropods, cattle, horses	New South Wales
<i>Bunyavirus</i>	Trubananan*	Fever, myalgia, polyarthralgia, rash	Anopheline mosquitoes	Possibly macropods, horses, cattle	Mainland Australia

*viruses that only cause rare or unconfirmed symptomatic infections of humans in Australasia ¹Papua New Guinea

一、科廷科技大學 (Curtin University of Technology)

(一) Murray Valley encephalitis virus (MVEV) (David T. Williams et al.)

墨累谷腦炎病毒(Murray Valley Encephalitis Virus, MVEV)是屬 *Flaviviridae* 科, *Flavivirus* 屬, 為日本腦炎血清群型之一, 另外包含此血清群型的病毒有日本腦炎病毒、西尼羅病毒、Alfuy virus (ALFV)、Koutango virus、Yaounde virus、Usutu virus, 及 Cacipacore virus 等。MVEV 基因組成爲單股正向 RNA, 長度約 11kb, 具封套。利用分子方式得知, MVEV 具 4 種基因型。ORF 轉譯成結構性及非結構性蛋白, 非結構性蛋白中, 與病毒 RNA 複製有關的爲 NS1, 爲與膜有關之糖蛋白 (membrane associated glycoprotein)。MVEV 傳播途徑爲蚊類、鳥類特別是水鳥 (Ciconiiformes, Pelecaniformes, Anseriformes) 的循環。在西澳地區, 約有 14 種蚊類分離到 MVEV, 主要攜帶病毒的蚊種爲 *Culex annulirostris*, 占 9 成以上。在西澳地區東北部, 水鳥 MVEV 抗體盛行率高。哺乳動物方面, 灰袋鼠及野兔爲 MVEV 主要增幅動物。在西澳地區使用哨兵雞監測該病毒活性部分, 幾乎每年每月皆有血清陽轉的雞隻出現。配合野外捕捉蚊類, 可判定在澳洲北部部分區域 MVEV 已爲地方性疾病 (enzootic), 如 northeast Kimberley。另外, Northern Territory, 亦爲 MVEV 地方性區域。澳洲中部地區則爲 MVEV 地方流行病區域 (epizootic), 如圖一所示。



圖一：MVEV 地方流行區域圖

病患大多無症狀或不具特徵性症狀, 發生腦炎機率約爲感染者之 200 至 1000 分之 1。潛伏期爲 5-28 天。無特殊療法, 以支持療法爲主, 在幼童及老人, 死亡率可至 20-25%。倖存者多有神經症狀的後

遺症。

MVEV 例行性監測，西澳地區以哨兵雞監測血清陽轉情形。若發現 MVEV 已開始活動，則通知相關衛生部門警告居民及旅遊者注意避免蚊類叮咬。另外，相關資訊包括蚊類繁殖現況、脊椎動物寄主數量及移動、環境現況包括雨量、溫度等氣候評估皆是監測 MVEV 活動的一環。

MVEV 診斷，以血清學方式為主，特別是 IgM 檢測，主要在得病後數天內出現。MVEV 可培養於 C6/36 白線斑紋細胞株，若要觀察細胞病變 (CPE, Cytopathic effect) 則需使用哺乳動物細胞株或免疫螢光染色單株抗體，可適用的哺乳動物細胞株包括 Vero, monkey embryo kidney, baby hamster kidney- 21, PSEK(porcine stable-equine kidney)，可產生明顯 CPE。接續的病毒檢測則用 EIA(fixed cell enzyme immunoassay), MVEV 專用單株抗體為 10C6，可配合其他抗原相關之黃病毒屬病原體做鑑別檢測。中和試驗則為偵測黃病毒抗體的標準準則 (gold standard)。在 PathWest(西澳傳染病檢驗研究中心)，疑似病例血清檢體採用 HI (hemagglutination inhibition) 及 IFA-IgM (Immuno fluorescent assay-IgM) 檢測。若為腦脊髓液 (CSF) 檢體則用 IFA-IgM 及 PCR 檢測，恢復期血清檢體則用 HI 測 IgG，重複試驗則用 epitope-blocking EIA。分子檢測方式則採用 RT-PCR，標的區域為病毒套膜及 NS5-3'UTR，分子檢測配合後續序列分析可得知 MVEV 基因型演化關係。若在有腦炎症狀病人 CSF 或 CNS 檢體測得病毒，進一步確診則用 Nested RT-PCR，引子序列如表二

表二：MVEV Nested RT-PCR 檢驗引子序列表

Primer name	Sequence(5'→3')	Gene target	Nucleotide position*	Amplicon size(bp)
MVE 739	CAGTCGTCGTTCCATCACAGT	Pre-membrane	737-757	784
MVE 1504	CATAGTCGCCCATCTTTGCT	Envelope	1502-1521	
MVE-S	GTCAGACGTTTCTACGGTGT	Envelope	1166-1185	273
MVE-C	AGAATAATTTCCATGACTGG	Envelope	1420-1439	

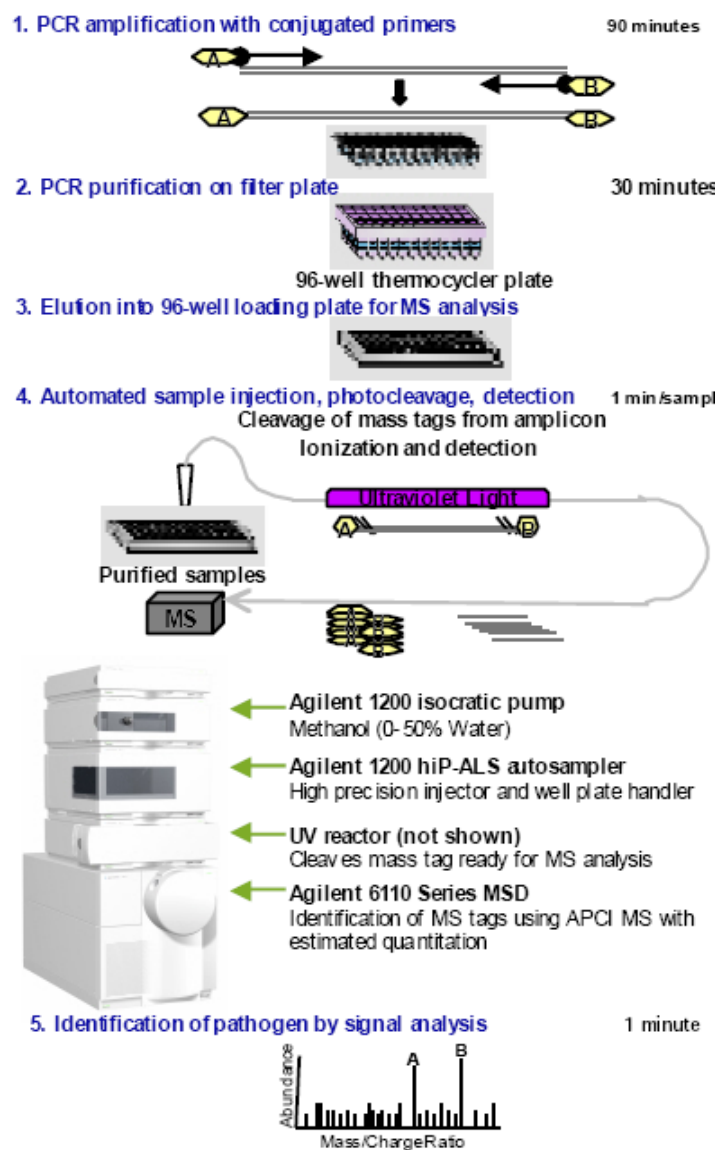
*Genbank number: NC_000943

現今進一步的分子檢測則往 MassTag PCR 及 Luminex suspension array system 邁進。

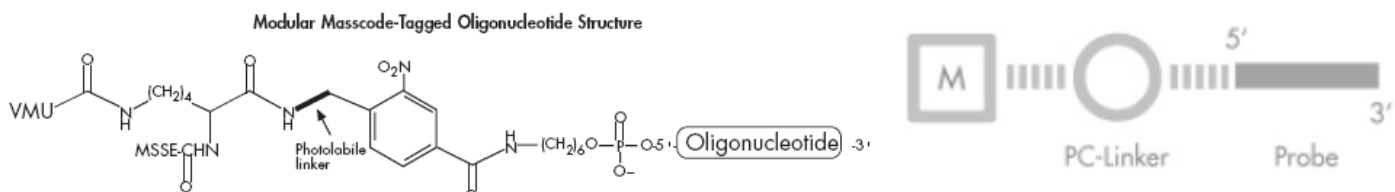
二、Mass Tag polymerase chain reaction (Mass Tag PCR) (Thomas Briese et al)

Mass Tag PCR 原理：利用多種不同的 masscode tag，與引子接合，在檢體與引子接合後，利用聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR/PCR)將標的物放

大，產物大小約在 50-300bp 之間，成品邊緣的 tag 在 UV 激發下得以偵測 tag 的量，進而推斷產物種類，來推斷檢體的病原體為何。該校與紐約哥倫比亞大學合作，針對不同病原體發展出 64 種 Masscode tags (Qiagen, Masscode technology)，引子設計使同一反應下的各對引子可以在同一個 melting temperature 作用，盡可能降低引子雜交的發生 (cross-hybridization potential)。引子在 5 端藉 photocleavable linker (PC-linker) 與 mass tag (M) 共價鍵結 (圖三)。各個引子鍵接不同分子量的 tags。因此核酸放大的產物。再純化後就可依特異訊號用 UV 激發，使 photocleavable linker 斷裂，再以質譜儀 (mass spectrometry) 分析不同的 Masscode tags，流程如圖二。



圖二：Mass Tag PCR 作用原理流程



圖三：Masscode tag 結構圖（左）及引子與 Mass Tag 鍵結圖（右）。M: Masscode Tag, PC-linker : Photocleavable linker, Probe:即為引子連結處。

目前該實驗室與紐約哥倫比亞大學合作已完成之套組如表三。

表三：MassTag PCR 引子套組 (Australian encephalitis/meningitis MassTag PCR panel)。

1. Routine	2. Arthropod / Zoonoses	3. Others
Enterovirus genus	Flavivirus genus	Enterovirus type 71
Herpes simplex virus type 1	Murray Valley encephalitis virus	Poliovirus
Herpes simplex virus type 2	Kunjin virus	Human parechovirus
Varicella-Zoster virus (HHV-3)	West Nile virus	Influenza A
<i>S. pneumoniae</i>	Japanese encephalitis virus	Influenza B
<i>Neisseria meningitidis</i>	Dengue (1-4)	Mumps virus
<i>H. influenzae b</i>	<i>Rickettsia typhi</i>	Measles virus
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Adenovirus genus
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Australian Bat Lyssa virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Lymphocytic choriomeningitis virus	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Henipavirus	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Coxiella burnetii</i>	
	<i>Leptospira</i>	
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	
Total = 9	Total = 14	Total = 11

二、西澳大學(University of Western Australia)節肢動物媒介病毒調查及研究實驗室 (The Arbovirus Surveillance and Research Laboratory)。

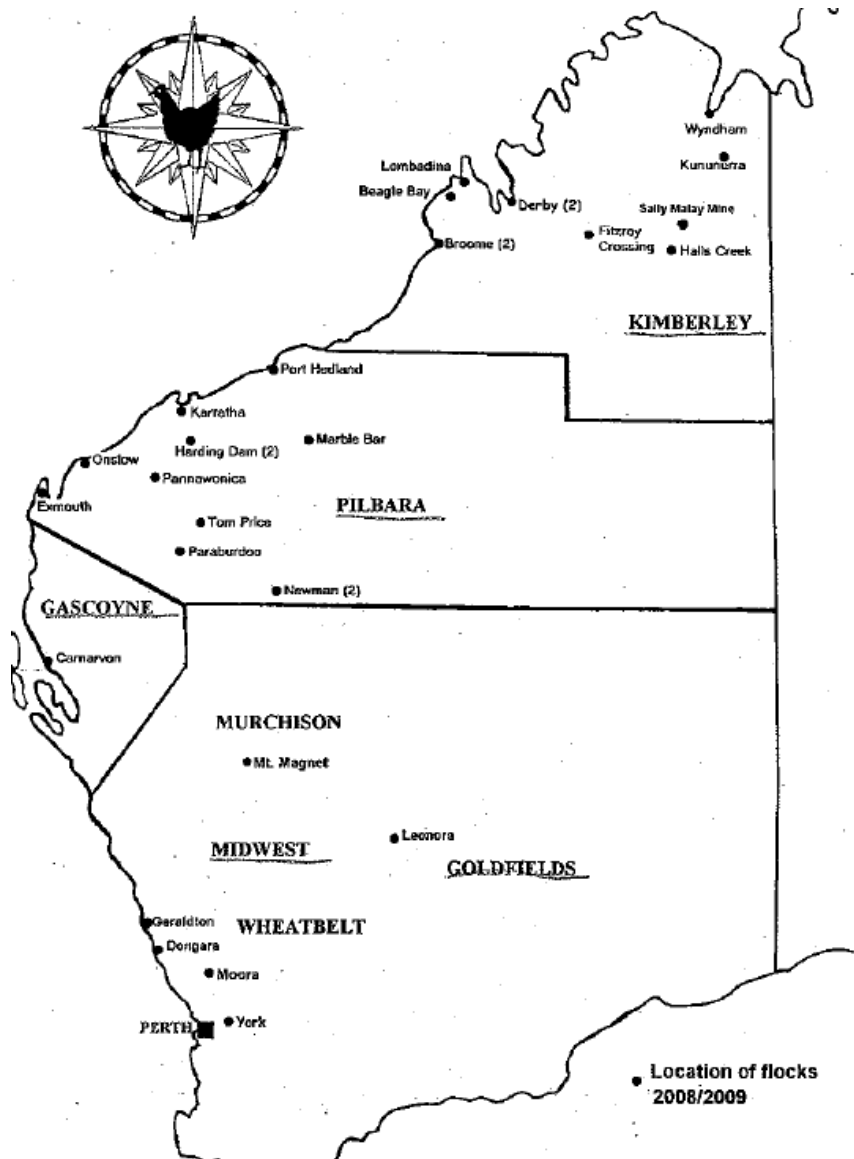
(一)西澳地區每年度例行性節肢動物媒介病毒檢測 (Cheryl Johansen et al, The University of Western Australia Arbovirus Surveillance and Research Laboratory Annual Report 2008-2009)

1. 哨兵雞監測 (Sentinel chicken surveillance)

西澳地區北部針對 flaviviruses 的監測採用哨兵雞血清抗體陽轉與否來監測 Murray Valley Encephalitis virus (MVEV)和 Kunjin virus(KUNV)的活動情形，包含範圍如圖六所示，其中包括 Kimberley, Pilbara, Gascoyne, Murchison, Midwest, 和 Goldfields。此計畫配合當地居民合作，定期取雞隻翼靜脈血液經由 PathWest 系統轉送至西澳大學節肢動物媒介病毒實驗室來偵測血清陽轉情形。每個定點放置 12 隻雞，於每年 9-10 月時更新雞隻。在雨季 (12-6 月) 期間，若超過 6 隻雞有血清陽轉情形，則會再更新雞隻 (圖四、五)。實驗室負責整個計畫，包括雞隻更新，個別族群管理則由地方政府、水務局人員、澳洲原住民環境健康工作者及訓練過的人員進行採血及雞隻管理工作。每個定點的所有雞隻在雨季期間每兩週採血一次，其他期間則每個月採血一次，裝在 5ml 的血清採集管中，藉由 PathWest 地方實驗室系統送至伯斯 PathWest (圖七)。檢測方式採用 blocking ELISA，採用之單株抗體為 3H6，針對黃熱病毒反應。若有血清檢體呈現陽性，則針對 MVEV (10C6)及 KUNV (3.1112G)個別的單株抗體再測試，3H6 陽性，但 10C6 及 3.1112G 呈現陰性，則會再測試日本腦炎 (989)，以確定西澳地區北方是否有日本腦炎病毒的活動。在發生血清陽轉情況時，會即時通知西澳政府衛生處 (Department of Health, DOH) 及環境衛生人員 (Environmental Health Officers, EHOs)，每個州的摘要報表會公布於網站上 (National Arbovirus and Malaria website, www.health.gov.au/arbovirus)。於 2008-2009 期間，在 30 個據點，4067 個雞隻血液檢體中，共 247 檢體有血清陽轉情形，占 6.1%。



圖四、五：更換雞隻時需為雞隻標記號碼 (Tag)，裝箱後，由早晨第一班飛機運送至需更換之監測點，大多在 9-10 月進行。



圖六：2008/2009 年西澳地區黃病毒（flavivirus）哨兵雞監測點，其範圍包括 Kimberley, Pilbara, Gascoyne, Murchison, Midwest 和 Goldfields。



圖七：雞隻血液檢體

2. 雞隻血清檢體處理及檢測

A. 收集雞隻血液檢體後，盡快處理，可於 4°C 冰箱存放 4 天。

- B. 血清離心 1000rpm ，5 分鐘，吸取血清。
- C. 用 coating buffer 稀釋 KUNV 和 MVEV 的抗原，稀釋後 4℃ 隔夜吸附（coating）在 96 孔微量效價盤上，每孔加入 50μl，其中兩個孔只加 coating buffer 作為對照用。96 孔微量效價盤在 4℃ 最多放置 5 天。
- D. 在水槽甩掉測試盤內液體後，用 EWB 緩衝液清洗兩次(Elisa wash buffer)。
- E. 測試盤加入 blocking buffer 100μl 在室溫放置 30 分鐘至 3 小時進行封鎖作用。
- F. 使用 master plate 以 1:10 稀釋檢體血清（135μl blocking buffer+15μl 血清），另需加入雞隻對照組血清。
- G. 30 分鐘後，甩去測試盤內 blocking buffer，每孔加入 50μl 已稀釋血清，每個檢體血清重複兩次，室溫下放置 2 小時。
- H. 等待期間配置用 blocking buffer 稀釋單株抗體，稀釋倍數如下表：

Ag	Ag dilution	MAb (monoclonal antibody)	MAb dilution	GAM
MVE	1:2000	3H6 (TropBio) flavivirus 10C6 (TropBio)	1:1000 1:250	1:1500 1:500
Kunjing	1:1000	3.1112G (BIOQUEST)	1:2000	1:1000
JE Nakayama	1:1000	989 tsnt	1:2.5	1:500

- I. 加入 50μl/ well Mab，輕拍測試盤以利混合，置於室溫 1 小時。
- J. 用 EWB 清洗測試盤 4 次，拍甩去殘餘洗劑。加入用 blocking buffer 稀釋的 GAM (Goat anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase ; HRPO) 50μl/well (1:2000)。靜置 1 小時。
- K. 用 EWB 清洗 6 次，拍甩去殘餘洗劑。
- L. 配置 30% 過氧化氫 (H₂O₂)，每 5ml Substrate buffer 需加入 100μl 30% H₂O₂ 及 100μl ABTS。加入測試盤中，每孔 100μl，靜置一小時。
- M. 使用 ELISA reader 判讀結果 415nm 及 492nm 波長
 $\%inhibition = 1 - (OD\ Test / OD\ Negative) \times 100$

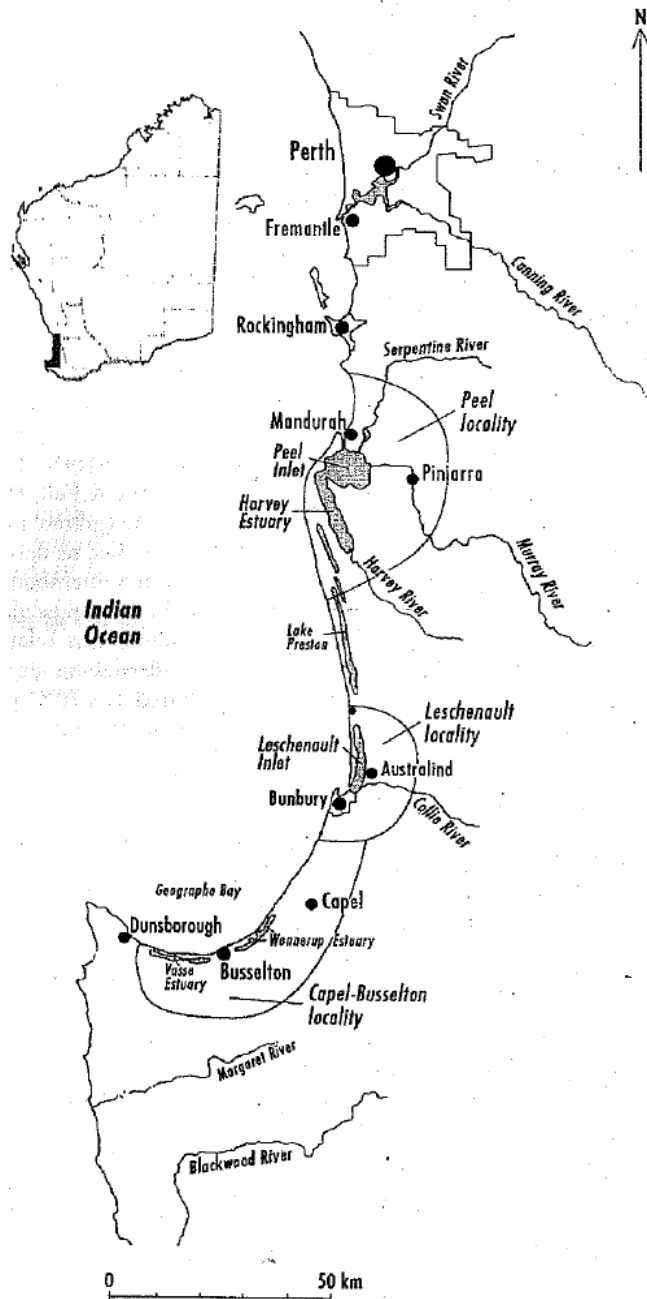
3. 西澳地區西南部病媒蚊定期捕捉監測

主要監測 RRV (Ross River Virus) 及 BFV (Barmah Forest virus)，晚春、夏季及早秋每兩週採集一次，其他季節則每個月採集一次，採集點自 Perth 往南至 Busselton 放置捕蚊器 (圖八)，隔日清晨再一一收回 (圖九)，氣候選擇於風速小、溫度適宜、高濕度之夜晚為佳。採集點是依照蚊群密

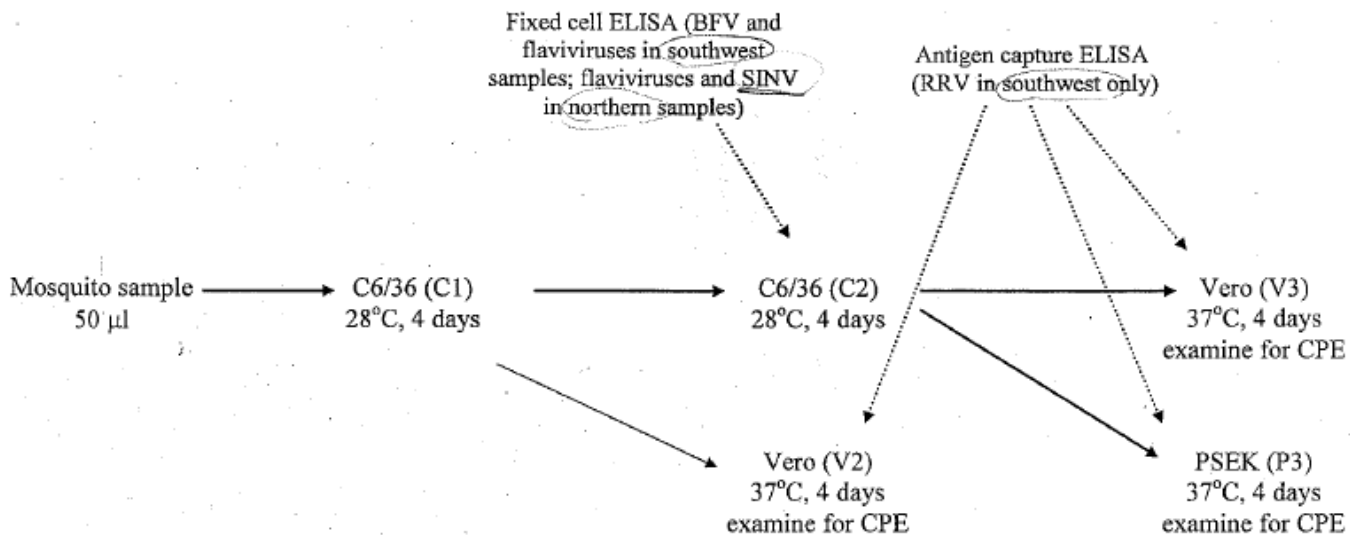
度放置，選擇高密度蚊群灌木區，亦是感染該病毒之脊椎動物的躲藏處，RRV 在西澳是地方流行病。採用 EVS/CO₂ mosquito trap。另在北部 Kimberley 會在雨季採集蚊類一次，通常在 3-5 月間，即雨季晚期 MVEV 及 KUNV 活動高峰期。蚊類採集後，放置於乾冰箱內在，再帶回實驗室檢測。檢測蚊子在研磨之後利用細胞培養病毒。培養程序如圖十。



圖八：捕蚊器（EVS/CO₂ mosquito trap）



圖九：西澳地區西南部節肢動物媒介病毒偵測捕蚊器放置地點，包括 Peel, Leschenault, Capel 和 Busselton 等區域。流行季節每兩週採集一次，其他時節則每個月採集一次。

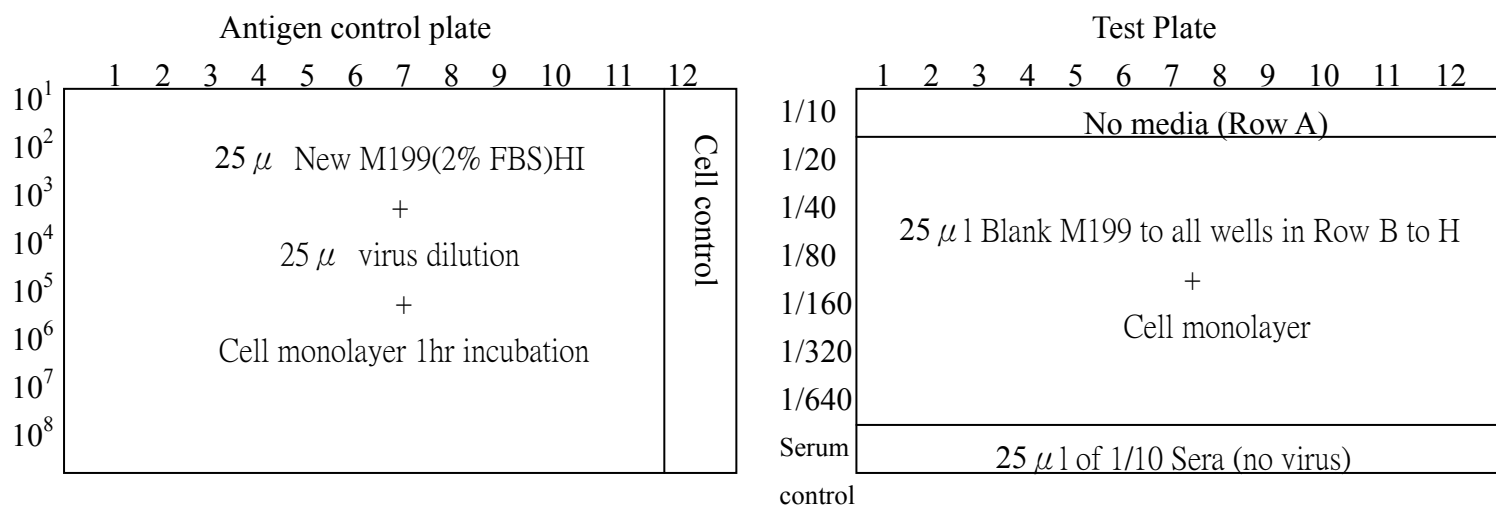


圖十：細胞培養節肢動物媒介病毒分離步驟，原始感染細胞及繼代細胞上清液劑量皆為 $50 \mu l$ 。

於 96 孔微量效價盤中，繼代兩次的 C6/36 細胞，其上清液繼代至 Vero 及 PSEK 細胞株，以觀察 CPE 情形。該 C6/36 細胞盤會利用丙酮固定進行以偵測黃熱病毒。在用去殘餘上清液後，用 PBS 清洗，每孔再加入 PBS/Acetone，在 4°C 培養 1 小時後，甩去液體，放置於 37°C 至隔日。西澳北部區塊病媒蚊之檢體，96 孔測試盤在隔日完成固定後，使用黃熱病毒單株抗體 4G2 偵測繼代第三代 Vero/PSEK 沒有形成 CPE 的檢體 (Fixed cell ELISA)。若為西南部檢體，則用單株抗體 9E8 (BFV) 及 4G2(Flavivirus) 偵測，若有病媒蚊檢體有細胞病變 (CPE)，但檢測非 flaviviruses 或 alphaviruse，則會採用分子鑑定方式檢測。若偵測少數節肢動物病毒，如 Bunyavirus 及 Orbiviruses，在無法用 antigen capture 或 fixed cell ELISA 偵測出來時，則會用微量中和試驗 (Microneutralisation test) 偵測。

4. 微量中和試驗 (Microneutralisation test)：於 antigen control plate (96 孔盤) 加入 10^4 vero cells/well 培養至少 1 小時，加入以熱去活性的培養液 New M199 $25\mu l$ ，及 10 倍稀釋病毒液以預測 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose)，最後一欄不加病毒液作為對照用。10 倍稀釋待測脊椎動物 (例袋鼠) 血清，放置於 56°C 水域槽 30 分鐘以熱去活性。加入培養液 M199 $25\mu l$ 於測試盤中 (除了 A 列外)，再加入已熱去活性的血清，2 倍稀釋，每個檢體重複 2 次。得知 TCID₅₀ 之稀釋病毒液倍數後，配置此倍數加入測試盤中，最後一列 (H) 不需加入，為血清對照組，最後加入 $100\mu l$ 細胞懸浮液達 10^4 vero

cells/well。將抗原對照盤及血清測試盤培養 5 天 (37°C, 5%CO₂) 以觀測CPE 情形，第 7 天再觀察一次，如必要則染methylene blue。如圖十一所示。



圖十一：微量中和試驗 96 孔效價盤示意圖。

(二)討論關於 *Wolbachia* 感染埃及斑蚊造成生命週期縮短之論文(University of Queensland)。(McMeniman C.J. et al, Science, Vol323, 2, Jan 2009)

一般病媒病原體(如登革熱病毒)在雌蚊體內穿過中腸，在體內組織複製，至感染唾腺及具有傳撥能力稱為 extrinsic incubation period (EIP)，登革熱及瘧疾 EIP 期間皆約 2 週。因此雌成蚊至少需存活 2 週以上才可能有傳播疾病的能力。絕對胞內寄生細菌 *Wolbachia pipiens* (wMelPop)，在自然界中可感染果蠅造成壽命縮短，並可垂直感染後代，造成 cytoplasmic incompatibility (CI)，即感染雄果蠅與未感染雌果蠅配對後，造成後代胚胎死亡。利用實驗室培養埃及斑蚊細胞株感染 wMelPop，持續繼代培養 3 年，並將已改良之 wMelPop 感染埃及斑蚊胚胎，飼養至成蚊，已感染雌成蚊最後培養兩株穩定品系，PGYP1 及 PGYP2，可分別持續感染到 G33 及 G30。與未感染對照組比較，已感染之 PGYP1 雌蚊存活天數為 27 天 (25°C) 及 25 天 (30°C)，對照組為 61 天 (25°C) 及 43 天 (30°C)，雄成蚊有類似情形。經四環黴素 (tetracycline) 處理之感染成蚊則與對照組存活天數相近，表示是因為感染 wMelPop 造成存活天數縮短。另在模擬在 Cairns 氣候環境下實驗，已感染 PGYP1 雌成蚊存活天數仍不及對照組的一半。在 CI 實驗部分，只要是 PGYP1 雄蚊與未感染雌蚊配對，卵孵化率則趨近於零，並研究發現 CI 情形不會被雄蚊年齡影響。雌蚊生育能力不會因感染 wMelPop 有明顯下降趨勢，垂直遺傳對於此菌傳播於埃及斑蚊族群很重要，若感染雌蚊與未感染雄蚊配對，幾乎近 99.74±0.26% 子子後代有感染 wMelPop。因此，感染 wMelPop 造成高 CI、高垂直感染率、生育能力不明顯下降，造成此病可傳

播性且維持高盛行率於埃及斑蚊族群中。若野外族群的埃及斑蚊存活天數在感染 wMelPop 後只剩一半，及可能降低病原體傳播，進而減少人類感染的機會。未來仍須進行田野試驗，以評估實際可行性。不同於化學性殺蟲劑，使用生物性防治，如 wMelPop 或昆蟲寄生真菌 (entomopathogenic fungi) 讓蚊類於生命晚期死亡，演化壓力產生抗性情形相對較低。因此，利用 Wolbachia 感染埃及斑蚊族群可望成爲低成本且具持續性的登革熱防治，特別是在都市較不能用一般化學防治的區域。

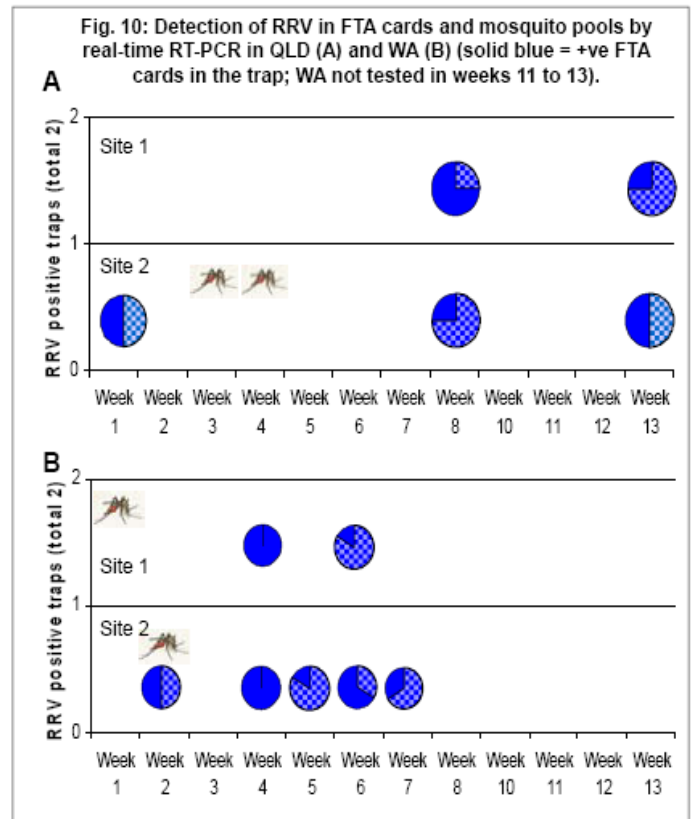
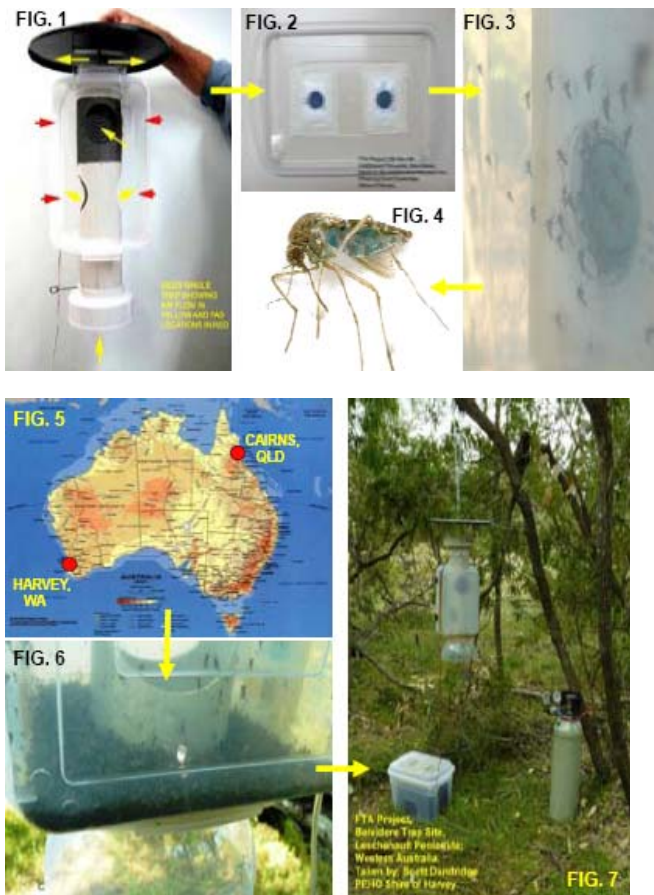
(三)利用FTA[®]卡偵測Ross River virus (Successful Field Trials of a Novel “Mosquito-Free” Arbovirus Detection System)。 (Sonja Hall-Mendelin et al.)

簡介：傳統節肢動物媒介病毒偵測採用哨兵動物或/和捕捉蚊子以偵測病毒的活動，此法費時費勞力且花費昂貴，且使用哨兵動物可能有道德和技術的問題產生。研發FTA[®]卡偵測法，不需捕捉蚊類，使用誘餌吸引蚊類吸食，蚊類將唾液分泌在FTA[®]卡上，用此卡偵測病媒蚊帶病毒情形，達到監測目的。

方法：於西澳 (WA) 及昆士蘭 (QLD) 區田野測試FTA[®]卡實際功效，使用自製Giles single box traps，內部擺置 4-6 片沾滿蜂蜜的FTA[®]卡，蜂蜜添加藍色食用色素以觀察被捕捉蚊類吸食蜂蜜情況(圖十二。Fig.1-Fig7)，被捕捉之蚊類(每池 \leq 500 隻)及FTA卡，需每週更換及用real-time RT-PCR偵測 Ross River virus RNA。在西澳地區實驗地點則接近節肢動物媒介病毒實驗室例行性偵測位置。

結果：Giles single box traps成蚊捕捉數量多，各有 42% (西澳) 及 74% (昆士蘭) 捕捉蚊類有吸取蜂蜜。並已實驗證實在田野注射高中低劑量之 RRV於FTA[®]卡，放置 1 週後與對照組偵測到的病毒Ct值無異，因此在野外放置 1 週的FTA[®]卡並不會降低偵測到的病毒量。以穩定度而言，FTA[®]卡的方式較一般濾紙保存Ross River virus RNA更加持久。昆士蘭地區，在進行 13 週中，有 3 週FTA[®]卡RRV偵測爲陽性，而捕捉的蚊子則有 2 週呈現陽性(圖十二，Fig.10A)。西澳地區，FTA[®]卡 10 週中有 5 週呈現陽性，捕捉之蚊類則有 2 週呈現陽性(圖十二，Fig.10B)。而在一般例行性補蚊監測結果，今年在西澳地區則尚未有RRV陽性的檢體出現。討論：結果顯示FTA[®]卡比傳統濾紙模式偵測Ross River Virus RNA成效更好。FTA[®]卡更可以快速使病毒不活化，然而在濾紙仍會存活 6 小時。此法可使用在偵測大群蚊類，不需捕捉蚊類即可定期監測蚊類攜帶病媒病毒情形。可配合現有監測模式，避免錯失其他新興病媒傳染病。未來的工作則會與西澳地區哨兵雞監視計畫比較偵測

黃病毒屬病毒（flaviviruses）的情形。



圖十二：Fig1:特製捕蚊器（Giles single box traps）。Fig2:FTA[®]卡沾附食用色素。Fig3-4:蚊類吸食後可見腹部染色。Fig5:實驗地區包括西澳及昆士蘭區。Fig6-7:放置圖。Fig10A: 昆士蘭地區，在進行 13 週中，有 3 週FTA[®]卡RRV偵測為陽性，而捕捉的蚊子則有 2 週呈現陽性。Fig.10B:西澳地區，FTA[®]卡 10 週中有 5 週呈現陽性，蚊類則有 2 週呈現陽性。

三、參觀 PathWest Laboratory Medicine Western Australia

(一) 使用 Multiplex **Tandem** RT-PCR 檢測病媒蚊攜帶多個節肢動物媒介病毒（Harnett GB et al.）。

利用兩階段性 PCR 方式，降低所需檢測費用，以達到降低成本並同時檢測多種節肢動物媒介病毒之目的。使用多重病毒篩檢方式可降低成本，亦可減少檢體用量，但此方式可能導致低複製量的病毒檢體因多引子競爭下被忽略。因此，在第一階段 RT-PCR，增殖至 20 個循環數，以將檢體目標核酸放大。再利用機械手臂自動將第一階段 dsDNA 產物加入二階段 TaqMan PCR，每組套組中包含三種 Probe，以表示三種病原，共有 19 個病毒的引子

(primers), 增殖 35 個循環數。並將此方式, 運用於西澳大學節肢病毒實驗室自 1970 年代的病媒蚊監測, 以檢測病媒蚊攜帶病毒情形, 並可與傳統細胞培養檢測方式比較。步驟如下。

1. 檢體收集: 檢測 50 池病媒蚊, 包括 20-25 種病媒蚊, 與 Medium 199 含 2 % 胎牛血清 (FCS) 均質化。
 2. 核酸萃取: 使用 Qiagen RNA Mini kit 抽取並純化病媒蚊體內病毒核糖核酸 (RNA)。
 3. 細胞培養: 萃取物進行 C3-36 細胞培養於 96 孔盤, 繼代兩次, 每代於 28°C 培養箱培養 4 天; 接著再繼代至 PSEK 細胞, 於 96 孔盤培養 4 天。病毒可利用單株抗體進行酵素免疫染色 (EIA) 檢測。
 4. PCR 分析: 第一階段 RT-PCR 使用 0.1 μ M 引子組, Superscript III (Invitrogen) RT-PCR mix, 0.5 u/tube DNA 聚合酶 (iSTAR, iNtRON, Korea), 核酸萃取物 8 μ L, 作用總體積為 20 μ L。RT-PCR 反應程序如下:
 - 50°C 30 分鐘 (RT step)
 - 94°C 5 分鐘
 - 94°C 30 秒 (denaturation), 50°C 30 秒 (annealing), 68°C 45 秒 (extension) 共 20 次循環。
- i. 第一階段 PCR 引子組包含之病毒如下 (另有 MS-2 RNA coliphage 作為 internal control):

Alphaviruses

Ross River Virus (RRV)
Barmah Forest Virus (BFV)
Chikungunya Virus (CHV)
Sindbis Virus (SINV)
Getah Virus (GEV)

Bunyavirus

Rift Valley Fever Virus (RVFV)

Flaviviruses

Murray Valley Encephalitis Virus (MVEV)
Japanese Encephalitis Virus (JEV)
Kunjin Virus (KUNV)
West Nile Virus (WNV)
Alfuy (ALFV)
Kokobera Virus (KOKV)
Edge Hill Virus (EHV)
Stratford Virus (STRV)
Zika Virus (ZIKV)
Dengue Viruses 1- 4(DENV)

- ii. 第二階段 triplex TaqMan PCR: 0.2 μ M 引子及探針組, 每組有三種病毒及探針 (probes)、1 單位 (unit) 的 iSTAR hot start DNA

聚合酶，6mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.01% bovine albumin，作用總體積為 20μL。第一階段產物用自動化設備稀釋 10 倍（CAS1200, Corbett, NSW, Australia），取 0.5μL 加入作用，進行 Real-Time PCR 之儀器為 RotorGene 6000（Corbett, NSW, Australia）。另外，再先前萃取過程加入低劑量之 MS-2 RNA coliphage 作為偵測 RNA 萃取、反轉錄、及去除 RNA 抑制因子過程是否成功的對照組。

反應程序如下：

94°C 2 分鐘 酵素活化（enzyme activation）

94°C 12 秒（denaturation），50°C 90 秒（annealing），72°C 20 秒（extension）共 35 次循環。

iii. 引子及探針套組如下：

- MVEV (FAM), KUNV (VIC), AFLV (Cy5)
- DENV1 (FAM), DENV2 (VIC), MS-2 (Quasar 670)
- WNV (FAM), EHV (VIC), STRV (Cy5)
- DENV3 (FAM), DENV4 (VIC), ZIKV (Quasar 670)
- BFV (FAM), SINV (CAL Orange), RVFV (Quasar 670)
- JEV (FAM), KOKV (VIC), MS-2 (Quasar 670)
- RRV (FAM), CHV (VIC), GEV (Quasar 670)

5. 結果：有 12 池檢體陰性，23 池陽性細胞培養與 PCR 檢測結果一致。另有 3 池只由 Tandem 檢出陽性，另有 4 池只由細胞培養方法檢出，Tandem，並未測出。有 7 池具重複感染的狀況只由 Tandem 檢測得到。然有因 WNV 敏感度較 KUNV 高，而測出 WNV 陽性，KUNV 陰性的情況出現，而 WNV 可能並未出現在澳洲。
6. 討論：使用 Tandem 方式較傳統細胞培養方式更能找出重複感染的蚊蟲檢體，第一階段並可於一般 PCR 儀器增殖，降低成本及時間。萃取成效及 RNA 抑制因子去除可藉 MS-2 RNA coliphage 為對照組得知，另外，使用自動化儀器操作可減少人為感染或污染之機率。

心得

這次至伯斯西澳大學、科廷科技大學及PathWest學習及訪問，搭起本局與西澳大學節肢動物病毒實驗室的橋樑。西澳地區流行之節肢動物病毒如Ross River virus及 Murray Valley Encephalitis virus監測系統，無論是哨兵雞或定點捕捉蚊類監測，已有 20 餘年的監測經驗，相當成熟及完善。對於未來發展新型監測模式，如使用FTA[®]卡，亦在研發進行中；病媒蚊帶病毒檢驗，multiplex RT-PCR亦為提高新興病媒病毒傳染病診斷敏感性及特異性的方法。未避免分子診斷技術忽略新興未知病源，傳統細胞培養檢測病毒感染，仍為該實驗室主要且必要之技術。該實驗室部分硬體設備，如捕蚊器及自動冷卻蚊種工作平台，亦值得學習。PathWest高效率PCR檢測模式，每週可檢測約 12,000 個臨床檢體令人印象深刻。對於澳洲盛行登革熱地區，如東北部昆士蘭，昆士蘭大學病媒研究科學家，發展令人盼於學習之生物防治技術，如使用Wolbachia或真菌類導致埃及斑蚊的感染至死亡，亦可參考做為台灣登革熱防治的方式之一。

建議

- 一、哨兵雞監測技術適用於包括禽類為宿主之一的病原體傳播鏈，如 Murray Valley Encephalitis virus, Kunjin virus, West Nile virus, Eastern Equine Encephalitis 等。倘未來台灣若有可能發生上述疾病的風險時，若需使用哨兵雞作為監測方式，可參考西澳地區模式。
- 二、Multiplex Tandem RT-PCR 檢測病媒蚊攜帶多個節肢動物媒介病毒。病媒蚊帶病毒檢測或臨床檢體檢測，可朝此方向邁進。
- 三、該實驗室在節肢動物媒介病毒偵測年報中，配合當地的雨量、潮汐、南方震盪指數 Southern Oscillation Index (SOI) 等氣候因子評估。建議雨量因子可放入傳染病年報，作為台灣常態性蚊蟲防治及監測項目之一。
- 四、建議未來可派員至澳洲昆士蘭地區學習登革熱病媒蚊生物防治技術。