

計畫編號：DOH 99-DC-2024

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

台灣地區日本腦炎病毒之監測

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：黃智雄

研究人員：舒佩芸、鄧華貞、林鼎翔、林巧、呂良振、蘇千玲、余勝凱、  
廖采苓、楊正芬、楊智翔、張梅君、鄭佳欣、胡懷菁

執行期間：99 年 1 月 1 日至 99 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 \*

## 目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-9)
(2) 材料與方法	(10-13)
(3) 結果	(14-17)
(4) 討論	(18-19)
(5) 結論與建議	(20-21)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(22)
(7) 參考文獻	(23-25)
三、表次	(26-29)
四、圖次	(30-37)
	共 (37) 頁

## 中文摘要

日本腦炎是由黃病毒科(Flaviviridae)黃病毒屬(Flavivirus)的日本腦炎病毒引起，它是亞洲地區特有的傳染病，也是台灣的地方性傳染病。台灣於 1968 年起開始實施全面幼兒預防接種之後，每年確定病例就開始急速下降至 10-35 例左右，而且兒童感染比例也同時減少。近 10 年來，確定病例之年齡層已逐漸上升，顯示台灣環境因素、病媒蚊生態、有免疫力之年齡層已發生變化。在病毒方面，1990 年以前，日本腦炎病毒第三基因型之病毒株 (GIII) 是亞洲地區最主要的流行株，但第一基因型 (GI) 之病毒株已陸續引進日本、越南、韓國、泰國及中國，正逐漸取代 GIII 病毒株。我們的病毒學監測結果顯示，台灣地區 2010 年大部分陽性病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I (台北市、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣)，僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 Genotype III (宜蘭縣、台中縣、高雄縣)。這與台灣地區 2005-2007 年的病毒皆屬於 Genotype III 明顯不同。也與 2008-2009 年開始由少數地方之病媒蚊分離出 Genotype I 日本腦炎病毒不同(台北市北投區關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場及台中縣霧峰鄉養豬場)。綜合結果顯示，台灣地區日本腦炎病毒正快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype I，可能會隨著日本趨勢，全面由 Genotype I 病毒取代。初步 PRNT 結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction，因此，現有的 Nakayama 疫苗，應能提供足夠的保護力。

**關鍵詞：**日本腦炎病毒、病媒性傳染病、病媒蚊、Genotype I、Genotype III

## 英文摘要

Japanese encephalitis (JE) is wide spread in Asia and is endemic in Taiwan. Since 1968, Taiwan began implementation of a comprehensive early childhood vaccinations and the confirmed cases quickly dropped to about 10-35 cases per year. During the past 10 years, the age of confirmed cases has gradually increased, suggesting that Taiwan's environmental factors, mosquito ecology, age related immunity has changed. Virological surveillance showed that the genotype III (GIII) strains of JE virus (JEV) is the most dominant epidemic strains circulated in Asia before 1990, but the genotype I (GI) strains have been gradually introduced into Japan, Vietnam, South Korea, Thailand and China, gradually replacing the GIII strains. Our surveillance data in 2010 showed that most of the JEV strains isolated or detected belong to GI (Taipei City, Hualien County, Taichung County, Kaohsiung County, Tainan County), and only a few JEV strains belong to the GIII (Yilan County, Taichung County, Kaohsiung County). This is in contrast to JEV isolates during 2005-2007, when all belong to GIII, and during 2008-2009, when a few JEV strains belong to the GI (Beitou District, Taipei City Guandu Nature Park; pig farms in Wujie Township, Yilan County, and Wufeng Township, Taichung County). Overall, the results show that JEV strains in Taiwan is rapidly shifted from GIII to GI, similar to Japan, where the GIII had been completely replaced by GI strains. Our preliminary PRNT results showed that JE patient sera contain high cross-reactive protective antibodies to both GI and G III strains, suggesting that the current Nakayama vaccine should induce high titer cross reactive antibodies providing adequate protective immunity.

**Keyword** : Japanese encephalitis virus 、 vector-borne infectious disease 、 mosquito vector 、 Genotype I 、 Genotype III.

## 前言

日本腦炎的流行區包含了大部份的亞洲地區，是亞洲地區相當重要的流行性腦炎傳染病。由於日本腦炎是經由病媒蚊傳染的，所以疫情的流行與氣候及季節兩大因素有關 (Vaughn, 1992)。在熱帶區域，日本腦炎為散發性流行，全年皆有，南印度、印尼、馬來西亞、新加坡、泰國南部的流行屬於此類；但在熱帶區域北部，日本腦炎的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季，發生的型態是爆發性，通常持續二到三個月，中國、日本、臺灣、印度北部、泰國北部、緬甸北部、越南的流行屬於此類。由於預防注射之有效實施，日本、南韓及臺灣的病例已減少很多，但鄰近的許多國家，包括中國大陸、菲律賓、印尼、馬來西亞、印度、尼泊爾等國都有許多日本腦炎患者，也時有流行的發生。

目前已知至少有五屬二十六種蚊子能傳播日本腦炎，其中最主要的病媒蚊就是三斑家蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)；而環紋家蚊(*C. annulus*)、尖音家蚊(*C. pipiens*)、東鄉斑蚊(*Aedes togoi*)、白頭家蚊(*C. fusocephalus*)、白吻家蚊(*C. vishnui*) 和環喙家蚊(*C. annulirostris*)等均能媒介此病 (Hu, 1962)。流行期初病毒利用動物→蚊→動物的方式傳播，當流行範圍擴大後出現動物→蚊→人的途徑。臺灣仍以豬為主要增幅動物，豬將病毒增幅後開始人的流行。所以每年都大約在豬抗體陽性率超過 50% 之後 1~2 週，出現當年流行季的第一名確定病例 (Wu, 1999)。

台灣流行季節主要在每年 5 至 10 月，病例高峰通常出現在 6-7 月 (Wu, 1999；Hsieh, 1961；grayston, 1962)。1955 年，日本腦炎被列入報告傳染病，隨後病例數呈現逐年增加的趨勢。歷年來通報病例數以 1967 年最多，共有 1024 名疑似病例，確定 273 例，死亡 206 例。1968 年開始全面實施疫苗接種，民眾罹患日本腦炎的情況即大幅改善。台灣

的日本腦炎流行狀況大致可分三個時期：一、1968 年以前（全面展開日本腦炎疫苗預防接種之前）發生率最高；二、1968~1975 年發生率逐年下降，至 1975 年降到最低點；三、1976 年以後雖稍有起伏，但大致呈穩定狀態。目前，每年的確定病例數都在十至三十五例間，成為可以控制的傳染病。

1965 年，政府在台灣北部四縣（北、桃、竹、苗）展開約 26 萬名兒童的疫苗效果評價（Hsu, 1971）。結果顯示，台灣地區 3 歲的兒童經二劑日本腦炎疫苗基礎接種後，可產生約 80% 的保護力。自民國 1968 年起，政府對兒童全面施行二劑日本腦炎疫苗注射，民國 63 年起增加一劑(共 3 劑)，民國 72 年起，再增加一劑對小學一年級生的追加接種，以延長免疫力。由於接種疫苗為預防日本腦炎最有效的方法，現行幼童日本腦炎疫苗接種時程為出生滿 15 個月接種第一劑，間隔 2 週接種第二劑，隔年接種第三劑，國小一年級則於學校集中接種第四劑（Wu, 1999；Ku, 1994）。為達預防成效，全國學幼童的日本腦炎疫苗接種，除少數延遲或追加的個案，均安排於 3 月至 5 月集中接種。

在臺灣地區血清流行病學與疫苗評估方面，Dr. Gu and Dr. King 等人曾於 1990-1992 年進行：(一)小琉球及東港學童的日本腦炎病毒血清流行病學調查研究，及 (二)小琉球（離島地區）、東港（台灣南部）及新店（台灣北部）幼兒接種日本腦炎疫苗後之中和抗體有效性評估（顧家綺，1993）。血清流行病學研究結果顯示：(一) 1990 年琉球鄉國小一年級至國中三年級學童（6 至 15 歲）中，日本腦炎病毒中山株的中和抗體總陽性率為 70% ，以 12 歲的 84% 最高，10 歲的 53% 最低；而該群學童血球凝集抑制抗體陽性率(JaGAr strain)隨著年齡的增加而漸增（從 6 歲的 33% 到 14 歲的 71% ）；(二) 1991 年琉球鄉國小一、二年級學童對日本腦炎病毒中山株的中和抗體陽性率分別是 84% 與 91% ；

而東港國小一、二年級學童該病毒的中和抗體陽性率分別是 64% 與 92%。在針對 15 至 40 個月大的幼兒進行日本腦炎疫苗有效性評估方面，綜合結果顯示，二劑的北京株疫苗即可達到 100% 的陽轉率；而第三劑的接種除了可以提升對同型病毒的中和抗體效價，更有助於加強與**異型病毒株**（包括台灣地區的**本土病毒株**）的中和反應。

最近，Dr. Liao 等人收集 2004-2007 年的醫院及大學學生血清檢體，進行了台灣地區日本腦炎中和性抗體之力價分析研究，以瞭解在現行疫苗施打政策下，抗體在個體內隨著年齡的增加其含量之變化（廖明一，2007）。研究結果顯示，以年齡層區分來看，日本腦炎中和性抗體陽性率是呈”V”字型之趨勢。十歲以前因疫苗的施打而有較高的陽性率，十歲以後陽性率隨年齡增加而有下降之趨勢，以 31~40 歲年齡層陽性率最低。40 歲以後因自然感染率人口多，陽性率隨年齡增加又有上升之趨勢。在高年齡層（~50 歲以上）中高抗體陽性率顯示自然感染所產生的抗體比疫苗接種較不易消滅。

在日本腦炎病毒分子流行病學研究方面，依據 E 基因分析親緣性可將日本腦炎病毒分成 5 種基因型別，即 Genotype I-V（Hasegawa et al., 1994; Williams et al., 2000; Uchil and Satchidanandam, 2001; Solomon et al., 2003; Nga et al., 2004），其中 Genotype III 基因型之病毒株在亞洲國家地理分佈最廣泛，包括日本、韓國、中國、台灣、越南、菲律賓、印度、和斯里蘭卡（Mackenzie et al. 2004）。1990 年以前，Genotype III 病毒株一直是此地區主要的流行株。然而，在過去 10 年間各國的監測研究資料顯示，Genotype I 病毒株已陸續傳播至日本、越南、韓國、泰國、和中國（Ma et al. 2003; Nga et al. 2004; Yang et al. 2004; Nitatpattana et al. 2008; Wang et al. 2007）等地，並逐漸取代 Genotype III 病毒株。最近，Nabeshima et al. 等報告 Genotype I 病毒株相當頻繁的自東南亞和

東亞大陸引進日本 (Nabeshima et al. 2009)，雖然其傳播機制並不十分清楚，但可能的途徑包括帶病毒的病媒蚊被風吹至遠處、鳥類的遷徙、和急性期感染者的流動或傳播等 (Mackenzie et al. 2004)。

Jan 等人於 2000 年之報告，將台灣地區 1983 至 1994 年間由蚊子分離出的日本腦炎病毒以部分 C/preM 基因進行親緣性分析，發現其皆屬於 Genotype III，並可分成 3 個 cluster；台灣北部及中部的病毒大部份屬於 cluster 1，南部的病毒則大部分屬於 cluster 2，與其他亞洲地區的病毒比較，cluster 1 的病毒株是較為台灣所特有 (Jan, 2000)。台灣在 1994 年後一直缺乏有系統的監測計畫與研究資料，因此對目前日本腦炎病毒之地理分佈與基因型現況不清楚。我們自 2005 年開始透過基因體計畫進行日本腦炎病毒監測，以 E 基因進行親緣性分析，結果顯示不管是蚊子、豬或人所分離出之病毒，在 2005-2007 年之分離株皆屬於 Genotype III，然而在 2008 年之 17 株分離病毒中，卻有 2 株屬於 Genotype I (**台北市北投區關渡自然公園及宜蘭縣五結鄉養豬場**) (Huang et al. 2010)。2009 年，又在台北市北投區**關渡自然公園**(共 6 株)及**台中縣霧峰鄉**(共 2 株) 分離到 Genotype I 病毒；但在 2009 宜蘭縣與花蓮縣所分離到的病毒則屬於 Genotype III。E 基因分析結果顯示，台灣地區 1998 至 2008 年間的 Genotype III 病毒是屬於同一群，和 Jan 等人報告中提及的 cluster 1 親緣關係較近，和 1990 年以前的病毒及疫苗株親緣關係較遠，顯示台灣地區日本腦炎病毒基因序列，隨著年代已逐漸本土演化，同時不同地理位置的病毒基因序列也會有些微的變異。上述監測結果顯示 Genotype I 日本腦炎病毒已經引進台灣地區，有逐漸散播可能，確定這些病毒的遺傳學的變化和抗原性對於日本腦炎疫苗的有效性評估是十分重要的。

綜合來看，台灣現行的疫苗株 (Genotype III 北京株或中山株) 屬於古老病毒株，與台灣現在流行的 Genotype III 本土病毒株在 E 基因序列



上有一些差距，現行疫苗株在人體所產生的抗體可能無法完全中和本地的日本腦炎病毒株。又 Genotype I 新病毒株之引進台灣地區，在 E 基因序列上與 Genotype III 原有病毒株有更大之差異，監測這些病毒的遺傳學的變化和抗原性，觀察是否與疫苗株之間的變異有加大的趨勢，對於日本腦炎疫苗的有效性評估是十分重要的。本計畫希望能加強監測，分離出台灣各地區具有代表性的本土流行病毒株，建立基因資料庫及流行病學基本資料，提供未來疫苗改進、開發及評估之參考。

## 材料與方法

1. 日本腦炎病媒蚊採集：在流行季節採集病媒蚊，是最有效的分離日本腦炎病毒方法，主要步驟如下：
  - 一、 5-6 月每周調查採集 1-2 次，選擇台灣北、中、南、東各地緊鄰水稻田之養豬戶及溼地，以人工掃網或乾冰掛網方式採集病媒蚊。
  - 二、 人工掃網採集時間在下午 6-9 時，乾冰掛網方式採集時間在下午 6 時至隔日清晨，病媒蚊則放入一般紙杯中帶回實驗室，記錄採獲蚊子數。
  - 三、 挑選已吸血之蚊子，在 25°C 下，以 10% 糖水餵食 5 天後，依種類、性別、地點、日期，每 50 隻集成 1 pool。蚊子 pool 使用組織溶解器(tissue lyser II, Qiagen, Hilden, Germany) 研磨，每 1 pool 蚊子混合在 500  $\mu$ L 緩衝液中均質化，再離心得上清液，取上清液進行 RNA 抽取及 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性檢體。
2. 抽取 RNA：RNA 抽取及純化病毒核酸，主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核糖核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。每一蚊子 pool 取 140  $\mu$ L 上清液，根據製造商的說明使用 QIAamp viral RNA mini kit (cat. no. 52,906, Qiagen, Hilden, Germany) 及自動化 DNA/RNA 抽取儀(Taigen LabStart, Taiwan)萃取病毒 RNA，最後將 RNA 溶於 70  $\mu$ l 純水 (Water, containing 0.02% sodium azide)。
3. 引子(Primer)的設計與合成：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 10 copies/Rxn，可藉由核酸引子之設計及純化、檢體核酸的萃取及純化、反應試劑之選擇、反應條件之修正等，改善系統之靈敏度及專一性。我們共用 3 套特異性的引子組來篩選日本腦炎病毒，分別為：

**(1) flavivirus-specific:**

60 nM (final concentration)

FL-F1: 5'-GCCATATGG TACATGTGGCTGGGAGC-3';

60 nM FL-R3:

5'-GTKATTCTTGTGTCCCAWCCGGCTGTGTCATC-3';

60 nM FL-R4:

5'-GTGATGCGRGTGTCCCAGCCRGCKGTGTCATC-3').

**(2) JEV-specific:**

200 nM JE3F1: 5'-CCCTCAGAACCGTCTCGGAA-3'

200 nM JE3R1: 5'-CTATTCCCAGGTGTCAATATGCTGT-3')

**(3) JEV GIII-specific primers:**

200 nM E12F: 5'-CTGGGAATGGGCAATCGTG-3'

200 nM E325R: 5'-TGTC AATGCTTCCCTTCCC-3').

4. 利用 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性病媒蚊檢體：我們利用 One-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性病媒蚊，real-time RT-PCR 增殖反應使用 Mx4000 quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, California, USA)。詳細的檢驗方法如前所述 (Shu, 2003)：(1)使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25  $\mu$ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5  $\mu$ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10  $\mu$ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50  $\mu$ l。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒。

5. 日本腦炎病毒的分離與鑑定：Real-time RT-PCR 陽性檢體將進一步進行病毒分離與基因定序。病毒的分離與鑑定，係將病人腦組織液(CSF)、或病媒蚊均質液經 C6/36、Vero 等常用之細胞株培養至少 7 天後分離出病毒，再以病毒專一性單株抗體【如 Flavivirus-specific mAb (D56.3)、JEV group-specific (E3.3)、dengue group-specific (ATCC HB114)】等做免疫螢光染色，或 Real-time RT-PCR 鑑定分離之病毒及其血清型 (Shu, 2009)。由於從病患檢體

分離日本腦炎病毒非常困難，少數成功分離的日本腦炎病毒係由急性期確定病例腦脊髓液，經細胞培養方法所得到。為避免病毒株產生變異，分離出病毒株於 T-25 培養瓶擴大培養後即分裝、冷凍於液態氮中。

6. 日本腦炎病毒株之選殖 (cloning): 初步分離之日本腦炎病毒，再經過二次病毒斑純化 (plaque purification) 培養，最後選出 5 株日本腦炎病毒株。不同來源的病毒株將進一步鑑定病毒株生長形態及進行基因序列等，比較各病毒株之差異。

7. 核酸定序: 對於具有代表性的分離病毒株，以病毒培養液為材料，進行 5' 端非轉譯區及整個結構基因的定序工作，RT-PCR 產物經瓊膠電泳分離及純化後，以 ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) 核酸定序儀定序 (315 定序實驗室)，表一為日本腦炎病毒結構基因的定序所用的引子。又所有人體分離出之日本腦炎病毒，會進行病毒完整基因之全長定序。

8. 日本腦炎病毒中和抗體效價測定: 以 BHK - 21 細胞 50% 溶斑減少試驗法 (50% Plaque Reduction Neutralization Test; PRNT50) 測定日本腦炎病毒中和抗體效價 (Russell, 1967)。簡單來說，在 24 孔培養板準備單層 BHK - 21 細胞，維持在 37°C 的二氧化碳培養箱。測試血清先於 56°C 水浴 30 分鐘做不活化處理。測試血清，陽性對照血清和陰性對照血清以 1:10 開始做 2 倍系列稀釋後使用。各日本腦炎病毒株以病毒稀釋液稀釋後 (病毒量為 600 - 700 PFU / ml)，與等量 (130 μl) 不活化抗血清檢體均勻混合，於 25°C 下反應 90 分鐘。再將 50 μl 病毒血清混合物感染 BHK - 21 細胞，於 5% 二氧化碳培養箱 37°C 培養 60 分鐘，使病毒吸附。然後，每孔添加含 1% 甲基纖維素培養基，於 5% 二氧化碳培養箱 35°C 培養 3~7 天。最後，以 0.9% NaCl 溶液洗掉甲基纖維素培養基，再以 Naphthol blue-black solution 染色，計算溶斑數。中和效價的定義是最高血清稀釋降低了 50% 溶斑數。

9. 間接免疫螢光抗體分析法 (IFA): (1) 製備抗原玻片: 將病毒培養之細胞，滴在 12 孔玻璃片上，室溫中風乾後，置於 -20°C 丙酮固

定 10 分鐘，室溫下乾燥，此抗原抹片可保存於-20°C 冰箱中或直接染色；(2) 加入待測之血清檢體（可做 20、40、80、160 倍連續稀釋），置於 37°C 培養箱 30 分鐘，之後將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液（換三次）洗去多餘之抗體，再以蒸餾水沖洗，在室溫中將玻璃片吹乾；(3) 將抹片加上 25 ul 螢光標記之山羊抗人抗體（FITC-Goat Anti-Human IgG），置於 37°C 培養箱 30 分鐘，之後將抹片清洗後，滴上甘油緩衝液及蓋玻片以螢光顯微鏡檢查。

## 結果

- 1. 日本腦炎病毒株之選殖 (cloning) 與序列分析：**由於所分離之日本腦炎病毒係約 1-50 隻蚊子集成 1 pool，經 RT-PCR 篩檢陽性，再經 C6/36 或 Vero 等細胞株培養約 7 天後分離出，為了解同一時間、同一地點分離出之日本腦炎病毒株之病毒異質性 (virus heterogeneity)，我們以病毒斑純化 (plaque purification) 方法進行單株化 (圖一)，每一個 isolate 各選殖出 4 個生長形態大小不一的單一病毒株 (clones)，並進一步鑑定 4 株病毒之生長形態與基因序列，比較各病毒株之差異。我們對 2005-2006 年在台灣不同地區，包括北部 (台北市、宜蘭縣、桃園縣)，中部 (台中縣、彰化縣)，南部 (台南縣、高雄縣) 和東部 (花蓮縣) 分離之日本腦炎病毒進行病毒斑純化及基因序列。2005 年在台灣不同地區，包括北部 (台北市、宜蘭縣、桃園縣)，中部 (台中縣、彰化縣)，南部 (台南縣、高雄縣) 和東部 (2382 nt) 分析結果，顯示同一分離病毒株經 plaque purification 所得之各單一病毒株，基因序列大致相同 (圖二)；事實上，同一時間、地點分離自不同 pool 之病毒株均很相似，已具有代表性，並不需要進行 plaque purification。又 2005-2008 年同一地點、不同年代之病毒分離株也非常相似，顯示為區域獨立演化所產生之本土病毒株，但不同地點分離之病毒株則有較大差異 (圖三)。
- 2. 2010 年日本腦炎病媒蚊採集、RT-PCR screening、及病毒分離：**我們在 5-6 月間每周調查採集 1-2 次病媒蚊，選擇台灣北、中、南、東各地緊鄰水稻田之養豬戶及臨海溼地 (台南縣七股鄉曾文溪口濕地 (台江國家公園)、台南市安南區四草濕地 (台江國家公園內

四草生態園區)、宜蘭縣蘇澳濕地、台北市北投區關渡自然公園濕地等),以人工掃網或乾冰掛網方式採集病媒蚊。為了能夠篩選出所有基因型的日本腦炎病毒,我們共使用 3 套特異性的引子組來篩選日本腦炎病毒。**圖四**為 2010 年病媒蚊採集之結果,包括 RT-PCR 陽性蚊子 pool 及病毒分離陽性結果。我們分別在花蓮縣壽豐鄉養豬戶、台中縣霧峰鄉養豬戶、宜蘭縣五結鄉養豬戶、台北市(北投區關渡自然公園/濕地)、台中市北屯區養豬戶等地分離出日本腦炎病毒。此外在高雄縣內門鄉養豬戶、台南縣下營鄉養豬戶及屏東縣竹田鄉養豬戶也篩選到 RT-PCR 陽性蚊子 pool,但未分離出病毒,為了解這些地方之病毒基因特性,RT-PCR 陽性蚊子 pool 也進行了基因定序工作。

3. **日本腦炎病毒 partial 3'UTR 基因的親緣性分析:** **圖五**為 2010 年病媒蚊採集 RT-PCR 陽性蚊子 pool 之基因定序分析結果。相當意外地,利用 partial 3'UTR gene (279 bp) 定序之親緣性分析,大部分地方日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I (台北市、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣),僅少數地方日本腦炎病毒屬於 Genotype III (宜蘭縣、台中縣、高雄縣)。這與台灣地區 2005-2007 年的病毒 E 基因(1500 bp)序列,不管是蚊子、豬或人,皆屬於 Genotype III 明顯不同。也與 2008 年首度由蚊子分離出 2 株 Genotype I 日本腦炎病毒(採集地點分別為台北市北投區關渡自然公園及宜蘭縣五結鄉養豬場),其餘 15 株仍屬於 Genotype III (包括宜蘭縣及花蓮縣分離株);及 2009 年持續在台北市北投區關渡自然公園分離到 Genotype I 病毒(共 6 株)及首度在台中縣霧峰鄉分離到 Genotype I 病毒(共 2 株),但在宜蘭縣及花蓮縣分離到的病毒則屬於 Genotype III。

4. **日本腦炎病毒 partial E 基因 (1144 bp) 的親緣性分析：**圖六 (Genotype I) 與圖七 (Genotype III) 為 2010 年病媒蚊採集 RT-PCR 陽性蚊子 pool 之 **partial E 基因 (1144 bp)** 定序結果。此結果與 partial 3'UTR gene (279 bp) 定序之結果相同，親緣性分析顯示，大部分地方日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I (台北市、宜蘭縣、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣、屏東縣)，僅少數地方日本腦炎病毒屬於 Genotype III (台中縣、高雄縣)。這與台灣地區 2005-2009 年的日本腦炎病毒主要屬於 Genotype III 明顯不同。**表二**為台灣地區日本腦炎病毒 2005-2009 年綜合監測結果，顯示台灣地區日本腦炎病毒正快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype I，未來數年內可能會隨著日本及大陸趨勢，全面由 Genotype I 病毒取代。
5. **日本腦炎病毒中和抗體效價測定：**圖八為 50%溶斑減少試驗法 (PRNT) 代表性實驗結果，使用日本腦炎確定病例恢復期血清，以 1:10 開始做 2 倍系列稀釋至 10240 倍後進行 PRNT。為了解日本腦炎確定病例恢復期血清對 Genotype I 及 Genotype III 病毒之 PRNT 抗體效價 cross-reaction 情形，我們挑選 Nakayama 疫苗株 (Genotype III)、9400131 (2005 年分離之 Genotype III, HL0505a-c1-M) (圖三) 本土株、及 9900193 (2010 年分離之 Genotype I, YL1006a-M) (圖六) 本土株進行初步實驗，測定台灣不同地區之日本腦炎確定病例恢復期血清之中和抗體。**表三**為 8 位病人基本資料，包括年齡、居住地、capture ELISA IgM and IgG 血清抗體效價高低等。**表四**為上述病人血清對 3 株病毒測定 PRNT 綜合結果，幾乎所有血清都對 Nakayama 疫苗株有較高之中和抗體，其次是 9400131 (HL0505a-c1-M 病毒株)，最低的是 9900193



(YL1006a-M 病毒株)。雖然我們無法確定上述病人血清是感染 Genotype I 或 Genotype III 日本腦炎病毒所引發之抗體，但合理懷疑認為 9400299B 病人血清（2005 年感染）很可能是抗 Genotype III 病毒，而其他 7 支 2010 年之病人血清中有一部分應是抗 Genotype I 病毒，因為 2010 年大部分病毒已由 Genotype III shift 到 Genotype I。因此，初步 PRNT 結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction。

6. **不同 Genotype I 與 Genotype III 日本腦炎病毒 E 蛋白基因序列差異分析：**表五為比較 11 株具代表性的 Genotype III（前 7 株）與 Genotype I（後 4 株）日本腦炎病毒之 E 蛋白基因序列(1500 bp) 相關性比較。結果顯示，Genotype III 各日本腦炎病毒之 E 蛋白胺基酸相似度為 94.1% 至 99.3% 間； Genotype I 中各日本腦炎病毒之 E 蛋白胺基酸相似度為 97.5% 至 99.6% 間；Genotype I 與 Genotype III 日本腦炎病毒 E 蛋白胺基酸之相似度為 96.8% 至 99.0% 間。由於這些病毒 E 蛋白胺基酸之相似度很高，中和抗體之 cross reaction 也非常高。

## 討論

日本腦炎病毒依據 E 基因分析可分成 5 種基因型別，即 Genotype I-V，其中 Genotype III 基因型之病毒株在亞洲國家地理分佈最廣泛，包括日本、韓國、中國、台灣、越南、菲律賓、印度、和斯里蘭卡。1990 年以前，Genotype III 病毒株一直是此地區主要的流行株。然而，在過去 10 年間 Genotype I 病毒株已陸續傳播至日本、越南、韓國、泰國、和中國等地，並逐漸取代 Genotype III 病毒株。

Jan 等人於 2000 年之報告，將台灣地區 1983 至 1994 年間由蚊子分離出的日本腦炎病毒以部分 C/preM 基因進行親緣性分析後，分成 3 個 cluster，台灣北部及中部的病毒大部份屬於 cluster 1，南部的病毒則大部份屬於 cluster 2，與其他亞洲地區的病毒比較後顯示 cluster 1 的病毒株是較為台灣所特有。我們自 2005 年開始監測台灣日本腦炎病毒分布，以 E 基因進行親緣性分析，結果顯示台灣地區 1998 至 2008 年間的大部份病毒是屬於同一群，和上述報告中提及的 cluster 1 親緣關係較近，和 1990 年以前的病毒及疫苗株親緣關係較遠 (Huang et al, 2010)，表示台灣地區日本腦炎病毒基因序列會隨著年代而改變，同時不同地理位置的病毒基因序列也會有些微的變化。

在 Genotype shift 方面，我們發現在 2005-2007 年之分離株皆屬於 Genotype III，然而 2008-2009 年間，我們首度在溼地或其鄰近地區(台北市北投區關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場及台中縣霧峰鄉養豬場)發現 Genotype I 日本腦炎病毒株。今年 (2010 年) 更發現在台灣大部分地區之日本腦炎病毒株皆屬於 Genotype I (台北市、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣)，僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 Genotype III (宜蘭縣、台中縣、高雄縣)。這與 2005-2007 年的病毒皆屬於 Genotype III 明顯不同，顯示台灣地區日本腦炎病毒正快速的由

Genotype III 轉移至 Genotype I (表二)，極可能會隨著日本及大陸趨勢，在未來數年內全面由 Genotype I 病毒取代，應繼續加強監測。

在疫苗保護力方面，了解 Genotype I 病毒株與 Genotype III 病毒株之抗原性差異，評估現有 Nakayama 疫苗株的有效性是十分重要的。我們挑選 Nakayama 疫苗株 (Genotype III)、9400131 本土病毒株 (2005 年分離之 Genotype III, HL0505a-c1-M)、及 9900193 本土病毒株 (2010 年分離之 Genotype I, YL1006a-M) 進行初步實驗，測定台灣不同地區日本腦炎確定病例恢復期血清之中和抗體。初步 PRNT 結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction，此結果顯示現有的 Nakayama 疫苗，應能提供足夠的保護力。進一步比較具代表性的 7 株 Genotype III 與 4 株 Genotype I 日本腦炎病毒之 E 蛋白基因序列，顯示 Genotype I 與 Genotype III 日本腦炎病毒 E 蛋白胺基酸之相似度為 96.8% 至 99.0% 間。由於這些病毒 E 蛋白胺基酸之相似度很高，能提供高效價、cross reactive、具保護力的中和抗體也是可以預期的。

## 結論與建議

日本腦炎與登革熱是台灣最重要的 2 種病媒性病毒傳染病，由於接種疫苗為預防日本腦炎最有效的方法，現行日本腦炎的主要防治策略即幼兒預防接種。1968 年開始全面實施疫苗接種後，民眾罹患日本腦炎的情況即大幅改善，目前，每年的確定病例數都在十至三十五例間，成為控制良好的傳染病。近年來，日本腦炎確定病例之年齡層有逐漸上升趨勢，研究顯示，日本腦炎中和性抗體陽性率是依年齡層呈”V”字型之趨勢。十歲以前因疫苗的施打而有較高的陽性率，十歲以後陽性率隨年齡增加而有下降之趨勢，以 31~40 歲年齡層陽性率最低。40 歲以後因自然感染率人口多，陽性率隨年齡增加又有上升之趨勢。因此，成人疫苗接種開始成為討論議題。

我們自 2005 年開始監測台灣地區日本腦炎病毒流行情形，監測結果顯示 2005-2007 年的病毒皆屬於 Genotype III。2008-2009 年，開始在台北市北投區關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場及台中縣霧峰鄉養豬場之蚊子分離到 Genotype I 病毒，顯示 Genotype I 日本腦炎病毒已經引進台灣，有逐漸散播可能。2010 年，更發現大部分陽性病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I（台北市、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣），僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 Genotype III（宜蘭縣、台中縣、高雄縣）。監測結果顯示，台灣地區日本腦炎病毒正快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype I，未來數年內可能會隨著日本趨勢，全面由 Genotype I 病毒取代，應加強監測，建立本土流行病毒株、基因資料庫及流行病學基本資料，提供未來防治政策參考。

在疫苗保護力方面，了解 Genotype I 病毒株與 Genotype III 病毒株之抗原性差異，評估現有 Nakayama 疫苗株的有效性是十分重要的。我們挑選台灣不同地區日本腦炎確定病例恢復期血清，進行 PRNT 實

驗，初步結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction，此結果顯示現有的 Nakayama 疫苗，應能提供足夠的保護力。

## 計畫重要研究成果及具體建議

### 1. 計畫之新發現或新發明

病毒學監測結果顯示，台灣地區 2010 年大部分陽性病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I（台北市、花蓮縣、台中縣、高雄縣、台南縣），僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 Genotype III（宜蘭縣、台中縣、高雄縣）。這與台灣地區 2005-2007 年的病毒皆屬於 Genotype III 明顯不同。也與 2008-2009 年開始由少數地方之病媒蚊分離出 Genotype I 日本腦炎病毒不同(台北市北投區關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場及台中縣霧峰鄉養豬場)。綜合結果顯示，台灣地區日本腦炎病毒正快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype I，未來數年可能會隨著日本趨勢，全面由 Genotype I 病毒取代，應積極加強監測。

現有日本腦炎 Nakayama 疫苗保護效果方面，初步 PRNT 結果顯示，日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction，此結果顯示現有的 Nakayama 疫苗，應能提供高效價、cross reactive、具保護力的中和抗體。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導，強調現有日本腦炎 Nakayama 疫苗能提供高效價、cross reactive、具保護力的中和抗體，鼓勵幼兒按計畫施打疫苗。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

因應未來氣候變遷，台灣地區可能發生登革熱、日本腦炎、及屈公病的共同流行，應加強病媒性傳染病監測，成立病媒性傳染病研究及防治中心，並配合實驗室為基礎的檢驗系統，有系統的進行各種病媒性病毒的監測、檢驗、與流行病學研究。

## 參考文獻

1. Buescher, E. L., and Scherer, W. F. 1959. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. IX. Epidemiologic correlations and conclusions. *Am J Trop Med Hyg* 8, 719-722.
2. Burke DS, Leake CJ. Japanese encephalitis In: Monath TP, ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1988;63-92.
3. Cates, M.D. W.C. McCroddan, W.C. Huang, S.F. Chiu, S.C. Lien, P.C. Lin and J.H. Cross, 1969. Japanese encephalitis virus surveillance in Taiwan I. Isolation from mosquitoes 1967~1968. *J. Formosan Med. Assoc.*, 68:663~665.
4. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., and Rice, C. M. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649-688.
5. Grayston, J. T., Wang, S. P., and Yen, C. H. 1962. Encephalitis on Taiwan. I. Introduction and epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 11, 126-130.
6. Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S., and Kobayashi, Y. 1992. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 191, 158-165.
7. Hsieh, W. C., Wang, S. P., and Rasmussen, A. F. 1961. Epidemiology of Japanese encephalitis (JE) on Taiwan in 1960. *J Formos Med Assoc* 60, 825-830.
8. Hsu, T.C., L.P. Chow, H.Y. Wei, C.L. Chen, S.T. Hsu, M. Kitaoka and H. Sunaga. 1971. A controlled field trial for an evaluation of effectiveness of mouse-brain Japanese encephalitis vaccine. *J. Formosan Med. Assoc.*, 70(2):55~62.
9. Hu SMK., J. Thomas Grayston. 1962. Encephalitis on Taiwan II. Mosquito Collection and Bionomic Studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11 : 131-140.
10. Huang Jyh-Hsiung, Ting-Hsiang Lin, Hwa-Jen Teng, Chien-Ling Su, Kun-Hsien Tsai, Liang-Chen Lu, Cheo Lin, Cheng-Fen Yang, Shu-Fen Chang, Tsai-Ling Liao, Sheng-Kai Yu, Chia-Hsin Cheng, Mei-Chun Chang, Huai-Chin Hu, and Pei-Yun Shu. 2010. Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 16:876-8.
11. Jan LR, Yueh YY, Wu YC, Horng CB, Wang GR. 2000. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 62:446-52.
12. Ku, C. C., King, C. C., Lin, C. Y., Hsu, H. C., Chen, L. Y., Yueh, Y. Y., and Chang, G. J. 1994. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J Med Virol* 44, 122-131.
13. Lewis, L., Taylor, H. G., Sorem, M. B., Norcross, J. W. & Kindsvatter, V. H. 1947. Japanese B encephalitis. *Arch Neurol Psychiatry* 57, 430-463
14. Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa M. 2003. A major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 69:151-4.
15. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 10 (12 Suppl):S98-109.
16. Nabeshima T, Loan HT, Inoue S, Sumiyoshi M, Haruta Y, Nga PT, Huong VT, del Carmen Parquet M, Hasebe F, Morita K. 2009. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. *J Gen*

17. Nga PT, del Carmen Parquet M, Cuong VD, Ma SP, Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS, Morita K. 2004. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *J Gen Virol.* 85:1625-31.
18. Nitatpattana N, Dubot-Pérès A, Gouilh MA, Souris M, Barbazan P, Yoksan S, de Lamballerie X, Gonzalez JP. 2008. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 14:1762-5.
19. Ooh MH, Lewthwaite P, Lai BF, et al. 2008. The epidemiology, clinical features, and long-term prognosis of Japanese encephalitis in central sarawak, malaysia, 1997-2005. *Clin Infect Dis.* 15;47(4):458-68.
20. Rosen, L. J.C. Lien and L.C. Lu. 1989. A longitudinal study of the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult and larval *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes in northern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40:557~560.
21. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 99:285-290.
22. Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Yueh, Y. Y., Chow, L., Chien, L. J., Chin, C., Lin, T. H., and Huang, J. H. 2001. Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination. *Vaccine* 19, 1753-1763.
23. Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Yueh, Y. Y., Chow, L., Chien, L. J., Chin, C., Yang, H. H., Lin, T. H., and Huang, J. H. 2002. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J Clin Microbiol* 40, 1840-1844.
24. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. 2003. Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I Real-Time Reverse Transcription-PCR for Dengue Virus. *J Clin Microbiol.* 41:2408-16.
25. Shu Pei-Yun, Chien-Ling Su, Tsai-Ling Liao, Cheng-Fen Yang, Shu-Fen Chang, Chien-Chou Lin, Mei-Chun Chang, Huai-Chin Hu and Jyh-Hsiung Huang. 2009. Molecular Characterization of Dengue Viruses Imported into Taiwan during 2003-2007: Geographic Distribution and Genotype Shift. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 80:1039-1046.
26. Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardoso MJ, Barrett AD. 2003. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia. *J Virol.* 77:3091-8.
27. Tseng, H. F., Tan, H. F., Chang, C. K., Huang, W. L., and Ho, W. C. 2003. Seroepidemiology study of Japanese encephalitis neutralizing antibodies in southern Taiwan: a comparative study between urban city and country townships. *Am J Infect Control* 31, 435-440.
28. Uchil PD, Satchidanandam V. 2001. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent *Am J Trop Med Hyg.* 65:242 - 51.
29. Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev.* 14:197-221.
30. Wang HY, Takasaki T, Fu SH, Sun XH, Zhang HL, Wang ZX, Hao ZY, Zhang JK, Tang Q, Kotaki A, Tajima S, Liang XF, Yang WZ, Kurane I, Liang GD. 2007. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J Gen Virol.* 88:885-94.
31. Williams, D. T., Wang, L. F., Daniels, P. W. & Mackenzie, J. S. 2000. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J Gen Virol* 81, 2471-2480.



32. Wu, C. J., Huang, H. W., and Tao, M. H. 2003. Induction of cross-protection against two wild-type Taiwanese isolates of Japanese encephalitis virus using Beijing-1 strain DNA vaccine. *Vaccine* 21, 3938-3945.
33. Wu, Y. C., Huang, Y. S., Chien, L. J., Lin, T. L., Yueh, Y. Y., Tseng, W. L., Chang, K. J., and Wang, G. R. 1999. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am J Trop Med Hyg* 61, 78-84.
34. Yang DK, Kim BH, Kweon CH, Kwon JH, Lim SI, Han HR. 2004. Molecular characterization of full-length genome of Japanese encephalitis virus (KV1899) isolated from pigs in Korea. *J Vet Sci.* 5:197-205.
35. 黃柏榮，黃耀雄，1996，“日本腦炎病例後遺症調查調查報告”，*疫情報導*，第12卷，第二期，頁35-42，六月。
36. 許麗卿，吳盈昌，何美鄉，林雪蓉，金傳春，許須美，盧志對，陳國東，洪其璧，1997，“臺灣北中南東四區山地和平地鄉3-6歲兒童日本腦炎病毒感染的血清流行病學研究”，*中華微免雜誌*，30：194-206
37. 顧家綺，1993，“臺灣地區日本腦炎疫苗評估與血清流行病學研究(1990-1992年)”，*國立台灣大學公共衛生研究所碩士論文*。
38. 黃素芬，廖明一，2007，*台灣地區日本腦炎中和性抗體之力價分析*，*輔英科技大學生物技術研究所碩士論文*。

**Table 1. Primers used for RT-PCR and DNA sequencing of C-prM-E genes of JEV.**

Primer	Sequence (5' to 3')	Genomic region*
JE5UTRF	AGA AGT TTA TCT GTG TGA ACT TCT TGG	5'UTR (1-27)
JE616R	CCT CAC ACA TGT AGC CGA CGT CT	PrM (593-615)
JE747R	TTC GCT TGG AAT GCC TGG TCC G	PrM (723-744)
JE747F	CGG ACC AGG CAT TCC AAG CGA A	PrM (723-744)
JE1309F	GGA AGC ATT GAC ACA TGT GCA AAA TT	E (1308-1333)
JE1360F	AGA ACA ATC CAG CCA GAA AAC ATC	E (1359-1382)
JE1448R	CGC TGA ATA ATT CCC ATG GTT TTC	E (1425-1448)
JE1839F	AGG CTG AAA ATG GAC AAA CTG GC	E (1839-1861)
JE1878R	GGT TGT GCC TTT CAG AGC CAG TTT	E (1854-1877)
JE2602R	AGG GAT CTG GGC GTT TCT GG	NS1 (2583-2602)
JE2636R	GCC TTC CTT GTG CGC TTT GT	NS1 (2617-2636)

\* Numbering from GenBank accession number AY303795 .

RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; JEV = Japanese encephalitis virus; C = capsid; prM = premembrane; E = envelope; UTR = untranslated region.

**Table 2. Summary of the distribution of JEV genotypes in Taiwan, 2005-2009.**

Region	Year					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
TP (台北市 北投區關渡)			GIII	GI GIII	GI	GI
TC (台中縣 霧峰鄉)	GIII	GIII		GIII	GI	GI GIII
TN (台南縣 下營鄉)			GIII	-	-	GI
KH (高雄縣 內門鄉)	GIII			-	-	GI GIII
PT (屏東縣)				-	GIII (東港鎮)	GI (竹田鄉)
YL (宜蘭縣 五結鄉)	GIII	GIII		GI GIII	GIII	GI
HL (花蓮縣 壽豐鄉)	GIII	GIII	GIII	GIII	GIII	GI
TY (桃園縣 觀音鄉)			GIII			
CH (彰化縣 永靖鄉)			GIII			

**Table 3. Summary of convalescent serum samples of confirmed JE cases used for PRNT.**

Patient serum	ELISA OD405				居住縣市	居住地	出生日
	Den IgM	JE IgM	Den IgG	JE IgG			
Serun9900095B	0.654	3.434	0.27	1.073	台南市	南區	49/9/10
Serun9900109B	0.235	3.469	0.085	0.37	台北縣	永和市	51/6/21
Serun9900113B	0.324	0.633	0.087	1.913	屏東縣	崁頂鄉	60/4/6
Serun9900147B	0.104	1.178	0.17	1.65	花蓮縣	吉安鄉	63/4/29
Serun9900190B	0.1	0.918	0.149	2.369	苗栗縣	頭份鎮	76/12/24
Serun9900203B	0.137	2.798	0.162	1.717	彰化縣	溪湖鎮	64/4/25
Serun9900221B	0.08	2.256	0.245	2.462	台中縣	太平市	78/9/5
Serun9400299B	0.083	2.135	0.16	2.955	雲林縣	斗六鎮	57/12/1

**Table 4. Variation of PRNT titers of JE patients tested to 3 different JEV strains.**

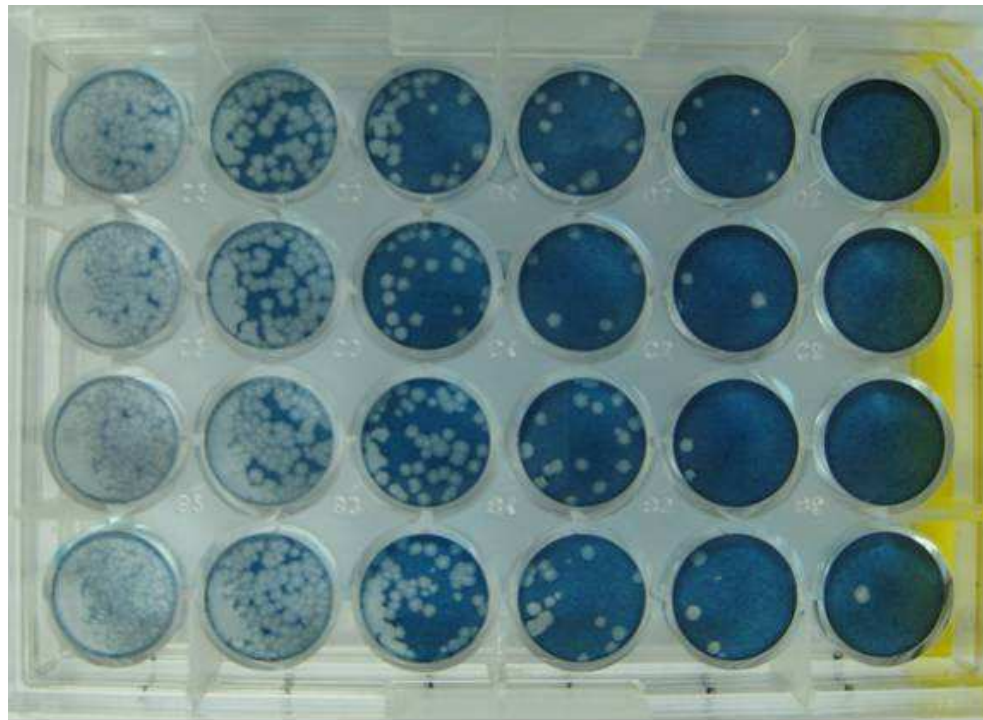
JEV strain	Patient serum							
	9900095B	9900109B	9900113B	9900147B	9900190B	9900203B	9900221B	9400299B
Nakayama-2/G III	1:320	1:1280	1:5120	1:1280	≥ 1:10240	≥ 1:10240	1:2560	≥ 1:10240
9400131-2/G III	1:40	1:40	1:1280	1:320	1:1280	1:1280	1:1280	≥ 1:10240
9900193/G I	1:20	1:10	1:1280	1:160	1:640	1:1280	1:1280	≥ 1:10240

**Table 5. Sequence variation at the nucleotide and amino acid levels between different JEV strains.**

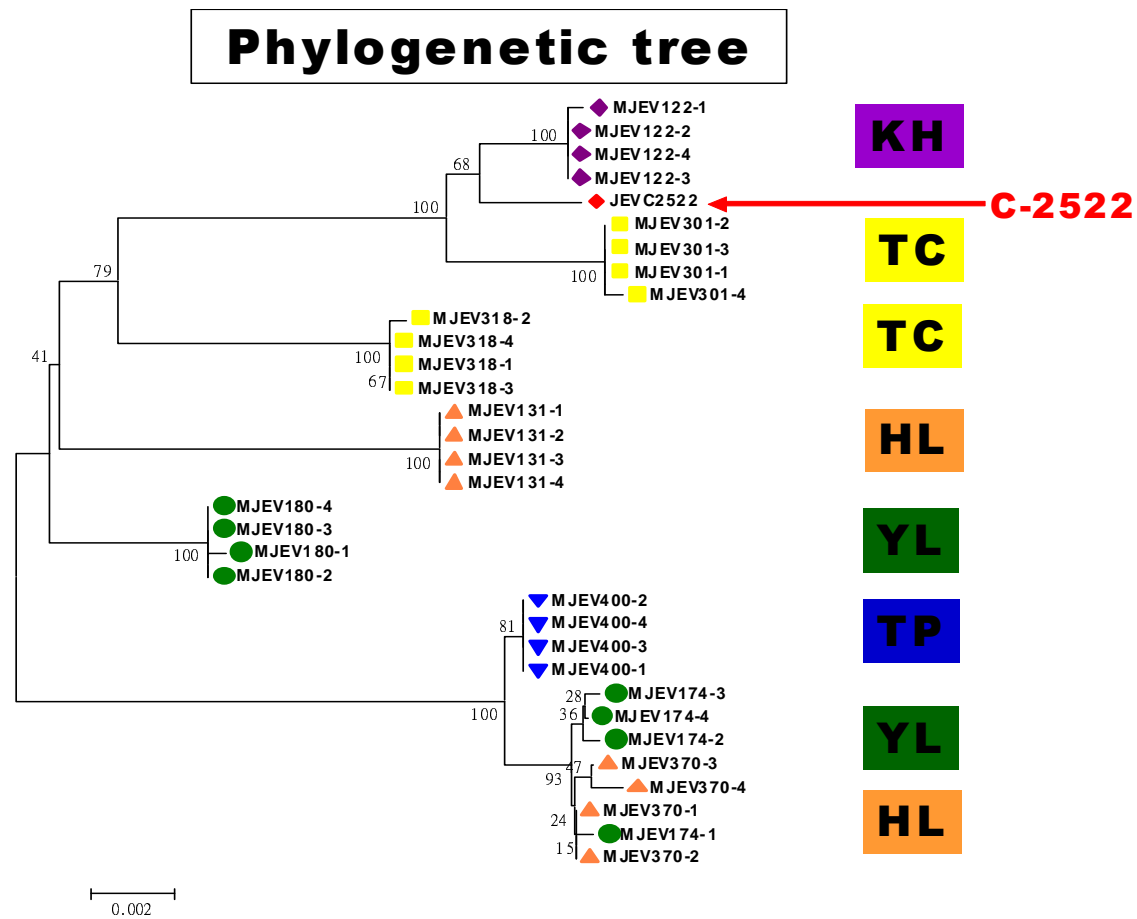
<b>JEV strain</b>	<b>SA-14-14-2</b>	<b>HL0905d</b>	<b>Beijing-1</b>	<b>Nakayama</b>	<b>CSF-2522-H</b>	<b>KH0505a</b>	<b>TC1006a</b>	<b>TPC0806c</b>	<b>TC1006h</b>	<b>TPC0906ah</b>	<b>YL1006a</b>
<b>SA-14-14-2</b>		<b>98.3%*</b> <b>(98.0%)</b>	<b>96.8%</b> <b>(97.2%)</b>	<b>96.5%</b> <b>(97.0%)</b>	<b>95.3%</b> <b>(97.6%)</b>	<b>95.2%</b> <b>(97.4%)</b>	<b>95.1%</b> <b>(97.6%)</b>	<b>88.0%</b> <b>(97.0%)</b>	<b>88.0%</b> <b>(97.0%)</b>	<b>87.3%</b> <b>(97.0%)</b>	<b>87.3%</b> <b>(96.8%)</b>
<b>HL0905d</b>	<b>26<sup>§</sup></b> <b>(10)</b>		<b>97.3%</b> <b>(99.2%)</b>	<b>97.2%</b> <b>(98.8%)</b>	<b>95.5%</b> <b>(99.6%)</b>	<b>95.5%</b> <b>(99.4%)</b>	<b>95.3%</b> <b>(99.6%)</b>	<b>88.6%</b> <b>(99.0%)</b>	<b>88.6%</b> <b>(99.0%)</b>	<b>88.2%</b> <b>(99.0%)</b>	<b>88.2%</b> <b>(98.8%)</b>
<b>Beijing-1</b>	<b>48</b> <b>(14)</b>	<b>40</b> <b>(4)</b>		<b>97.7%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>94.6%</b> <b>(98.8%)</b>	<b>94.4%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>94.5%</b> <b>(98.8%)</b>	<b>88.4%</b> <b>(98.2%)</b>	<b>88.4%</b> <b>(98.2%)</b>	<b>87.7%</b> <b>(98.2%)</b>	<b>87.7%</b> <b>(98.0%)</b>
<b>Nakayama</b>	<b>52</b> <b>(15)</b>	<b>42</b> <b>(6)</b>	<b>34</b> <b>(8)</b>		<b>94.3%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>94.1%</b> <b>(98.2%)</b>	<b>94.3%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>88.1%</b> <b>(97.8%)</b>	<b>88.1%</b> <b>(97.8%)</b>	<b>87.4%</b> <b>(97.8%)</b>	<b>87.4%</b> <b>(97.6%)</b>
<b>CSF-2522-H</b>	<b>71</b> <b>(12)</b>	<b>67</b> <b>(2)</b>	<b>81</b> <b>(6)</b>	<b>85</b> <b>(8)</b>		<b>98.6%</b> <b>(99.8%)</b>	<b>99.3%</b> <b>(100%)</b>	<b>88.0%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.8%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.6%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.6%</b> <b>(98.4%)</b>
<b>KH0505a</b>	<b>72</b> <b>(13)</b>	<b>68</b> <b>(3)</b>	<b>84</b> <b>(7)</b>	<b>88</b> <b>(9)</b>	<b>21</b> <b>(1)</b>		<b>98.5%</b> <b>(99.8%)</b>	<b>87.8%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>87.7%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>87.4%</b> <b>(98.4%)</b>	<b>87.4%</b> <b>(98.2%)</b>
<b>TC1006a</b>	<b>74</b> <b>(12)</b>	<b>70</b> <b>(2)</b>	<b>82</b> <b>(6)</b>	<b>86</b> <b>(8)</b>	<b>10</b> <b>(0)</b>	<b>23</b> <b>(1)</b>		<b>87.8%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.8%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.6%</b> <b>(98.6%)</b>	<b>87.6%</b> <b>(98.4%)</b>
<b>TPC0806c</b>	<b>180</b> <b>(15)</b>	<b>170</b> <b>(5)</b>	<b>174</b> <b>(9)</b>	<b>178</b> <b>(11)</b>	<b>180</b> <b>(7)</b>	<b>183</b> <b>(8)</b>	<b>182</b> <b>(7)</b>		<b>99.1%</b> <b>(99.6%)</b>	<b>97.9%</b> <b>(99.6%)</b>	<b>97.9%</b> <b>(99.4%)</b>
<b>TC1006h</b>	<b>180</b> <b>(15)</b>	<b>170</b> <b>(5)</b>	<b>174</b> <b>(9)</b>	<b>178</b> <b>(11)</b>	<b>183</b> <b>(7)</b>	<b>184</b> <b>(8)</b>	<b>183</b> <b>(7)</b>	<b>14</b> <b>(2)</b>		<b>97.5%</b> <b>(99.6%)</b>	<b>97.5%</b> <b>(99.4%)</b>
<b>TPC0906ah</b>	<b>190</b> <b>(15)</b>	<b>176</b> <b>(5)</b>	<b>184</b> <b>(9)</b>	<b>188</b> <b>(11)</b>	<b>186</b> <b>(7)</b>	<b>189</b> <b>(8)</b>	<b>186</b> <b>(7)</b>	<b>32</b> <b>(2)</b>	<b>38</b> <b>(2)</b>		<b>99.6%</b> <b>(99.8%)</b>
<b>YL1006a</b>	<b>190</b> <b>(16)</b>	<b>176</b> <b>(6)</b>	<b>184</b> <b>(10)</b>	<b>188</b> <b>(12)</b>	<b>186</b> <b>(8)</b>	<b>189</b> <b>(9)</b>	<b>186</b> <b>(8)</b>	<b>32</b> <b>(3)</b>	<b>38</b> <b>(3)</b>	<b>6</b> <b>(1)</b>	

**§ : difference in nucleotide/amino acid number**

**\*: 1 - p distance ; ( ) : amino acid**

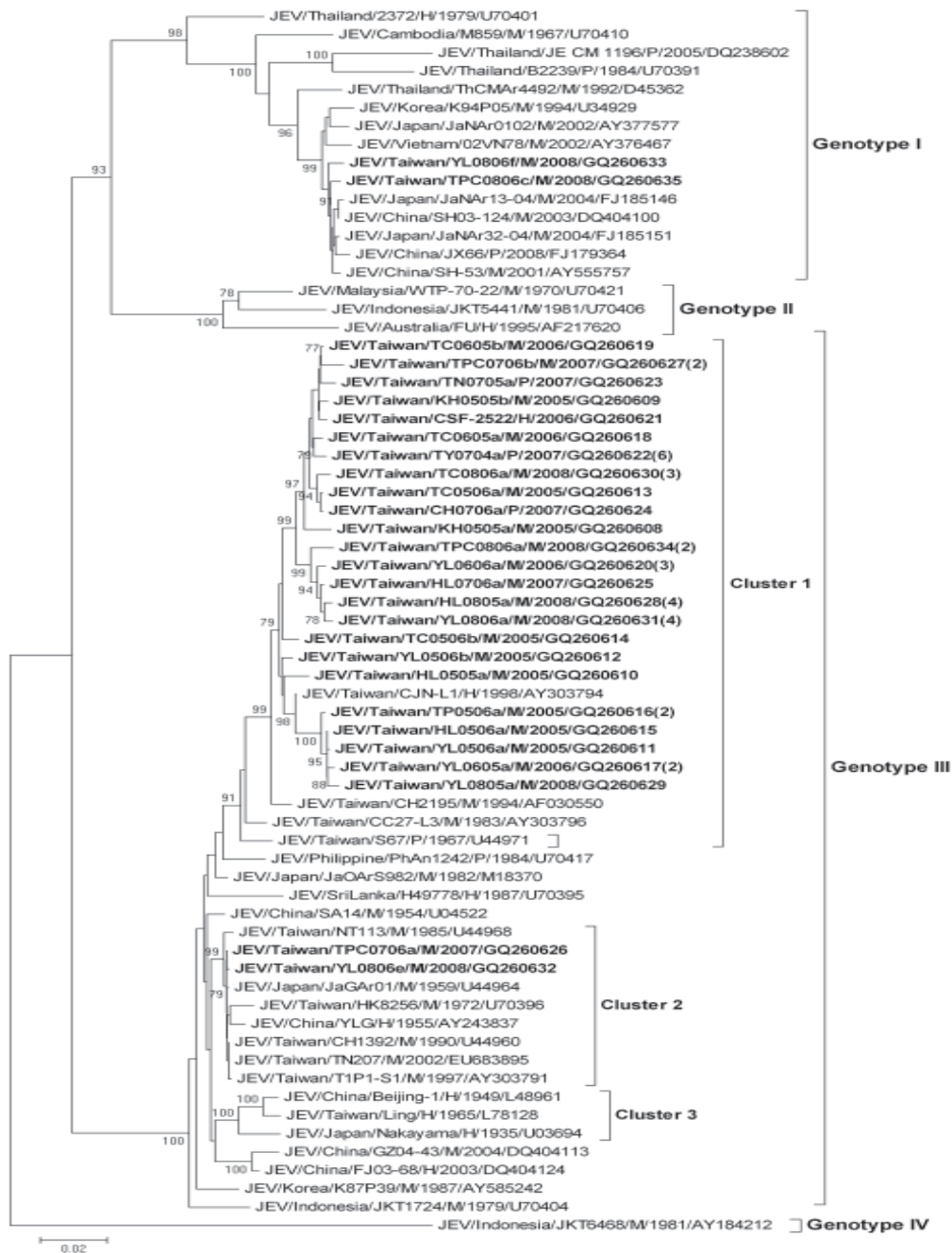


**Figure 1. Representative data showing isolation of JEV clones by plaque purification. Plaque purification was used to isolate JEV clones from each positive mosquito pool obtained from different geographic regions in Taiwan, 2005.**

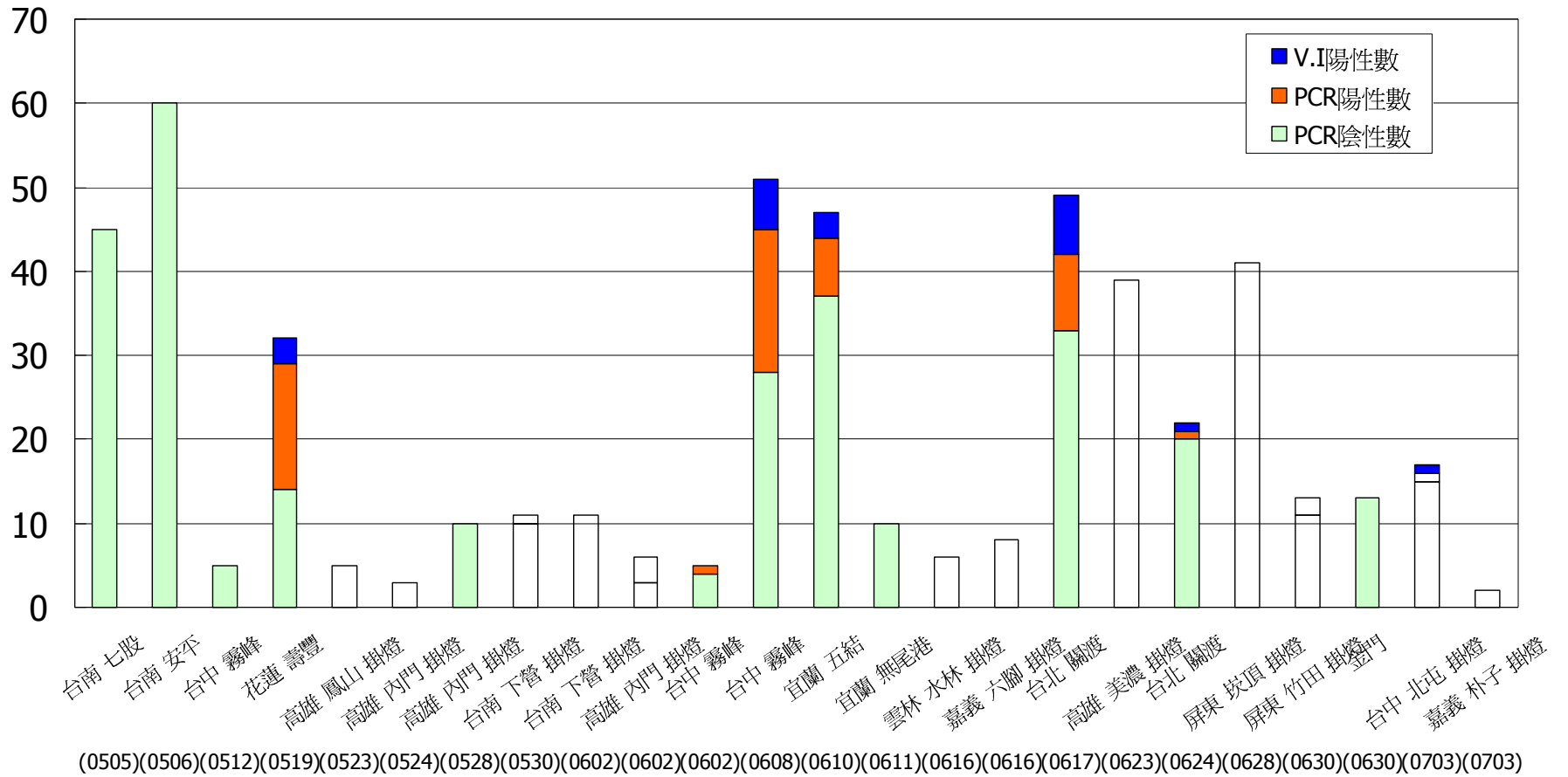


**Figure 2. Genetic analysis of plaque-purified JEV clones isolated from different geographic regions in Taiwan, 2005.**

**Figure 3. Phylogenetic tree of 72 Japanese encephalitis virus (JEV) strains, 2005-2008. The tree was constructed on the basis of complete E gene nucleotide sequences. Sequences obtained in this study are designated by boldface type. Viruses were identified by using the nomenclature of virus/country/strain/source/year of isolation/GenBank accession number. M=mosquito pool; P=pig serum; H=human samples.**

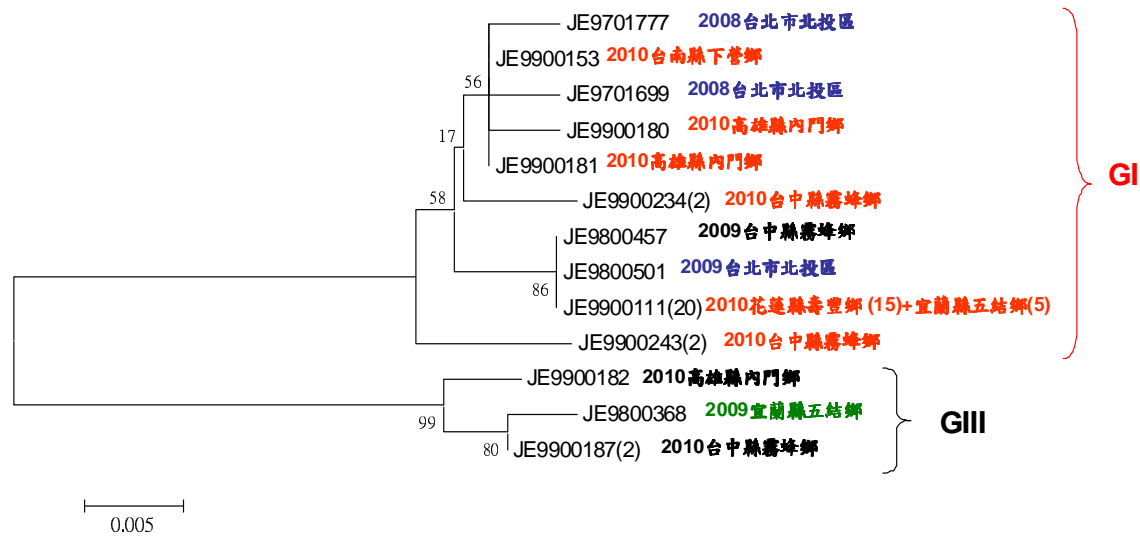






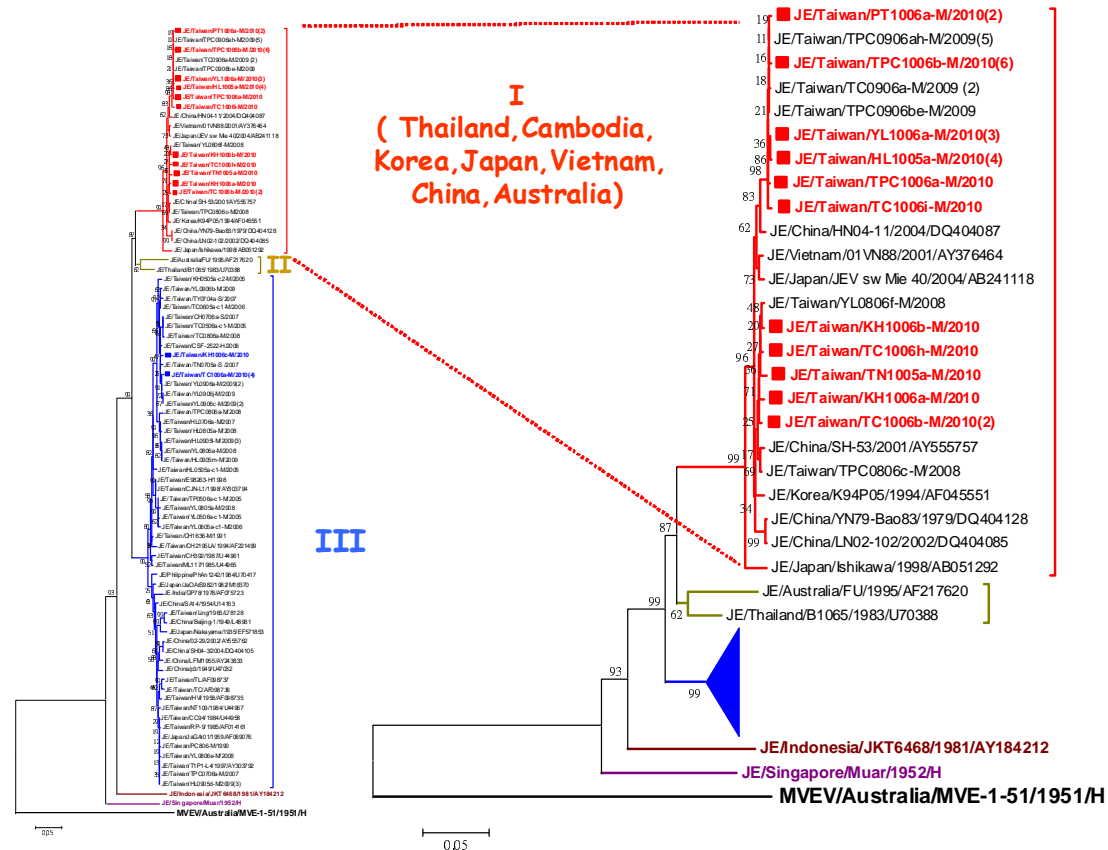
**Figure 4. Summary of mosquito collection, positive pools screening and JEV isolation in Taiwan, 2010.**

Phylogenetic tree of partial 3'UTR gene (279 bp) in JE virus



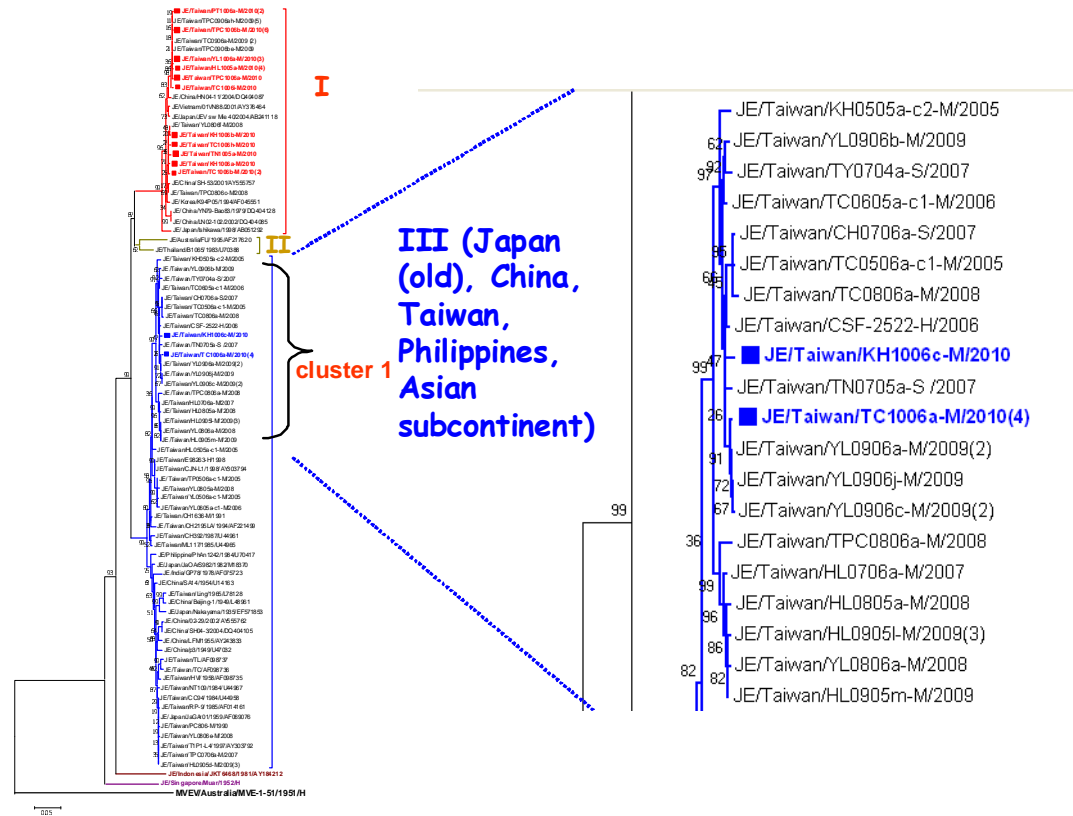
**Figure 5. Phylogenetic relationships of Japanese encephalitis virus (JEV) isolated or detected from different geographic regions in Taiwan, 2008-2010. Partial 3'UTR gene (279 bp) of JEV isolates or RT-PCR positive mosquito pools were sequenced to determine the genetic relationship of these local strains.**

## Phylogenetic tree of partial E gene (1144 bp) in JEV

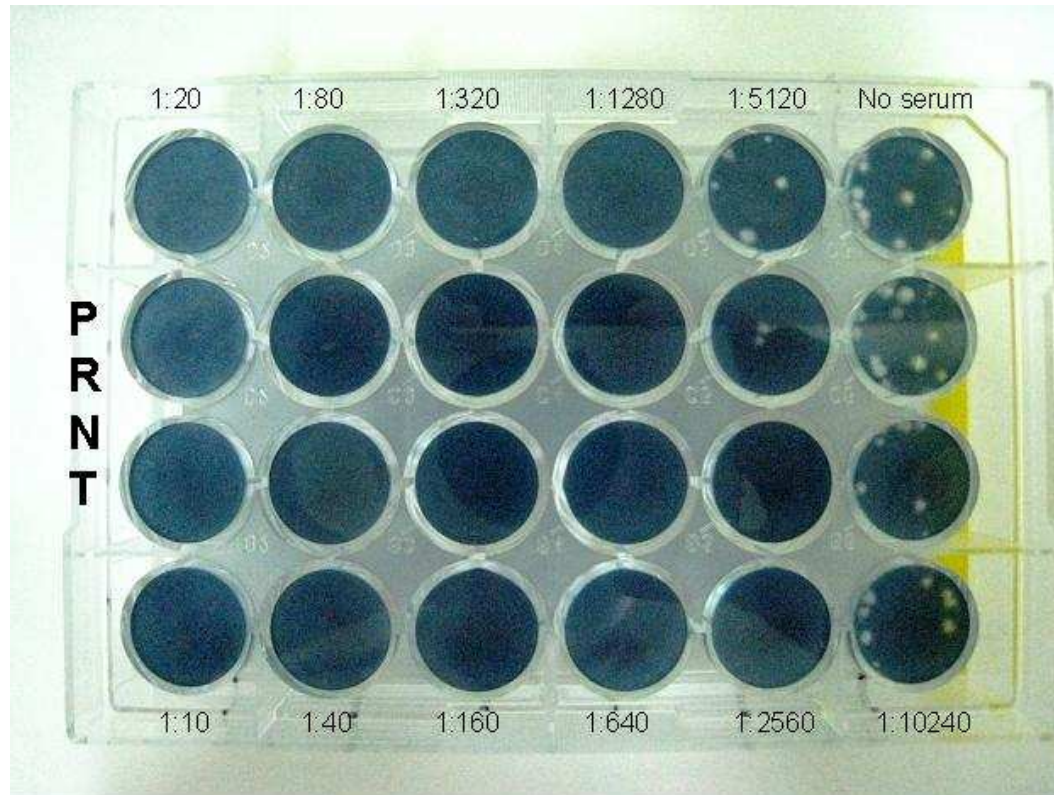


**Figure 6. Phylogenetic relationships of genotype I Japanese encephalitis virus (JEV) isolated or detected from different geographic regions in Taiwan, 2008-2010. Partial E gene (1144 bp) of JEV isolates or RT-PCR positive mosquito pools were sequenced to determine the genetic relationship of these local strains.**

## Phylogenetic tree of partial E gene (1144 bp) in JEV



**Figure 7. Phylogenetic relationships of genotype III Japanese encephalitis virus (JEV) isolated or detected from different geographic regions in Taiwan, 2005-2010. Partial E gene (1144 bp) of JEV isolates or RT-PCR positive mosquito pools were sequenced to determine the genetic relationship of these local strains.**



**Figure 8. Representative data showing the neutralization antibody titers calculated by 24 wells plaque reduction neutralization tests.**