

計畫編號：DOH 102-DC-2211

行政院衛生福利部疾病管制署 102 年度科技研究發展計畫

台灣地區登革及日本腦炎病毒之監測與特性分析

## 研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：舒佩芸

協同主持人：鄧華真

研究人員：蘇千玲、楊正芬、呂良振、林巧、陳育瑜、張梅君、胡懷菁、  
張淑芬

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制署意見 \*

## 目 錄

	頁 碼
封面	
中文摘要	(3-4)
英文摘要	(5-6)
本文	
(1) 前言	(7-10)
(2) 材料與方法	(11-12)
(3) 結果	(13-14)
(4) 討論	(15-16)
(5) 結論與建議	(17-18)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(19-20)
(7) 參考文獻	(21-22)
表次	(23-26)
圖次	(26-32)

共 (32) 頁

## 中文摘要

登革熱與日本腦炎是台灣最重要的病媒病毒傳染病(vector-borne viral diseases)。登革熱是由登革病毒感染所引起。由分子流行病學及病毒基因親緣分析顯示，台灣的登革熱流行主要是由每年從境外引入新的登革病毒所造成，流行從夏季開始至冬季結束，少數登革病毒株可越冬，在隔年夏天再度造成流行。本計畫持續監測本土與境外登革病毒株之來源及擴散情形。監測結果顯示 2013 年 4-11 月共有 6 株登革病毒 (2 株 DENV-1、3 株 DENV-2 及 1 株 DENV-3) 在台灣流行，主要發生在屏東縣市。首例出現於屏東縣春日鄉，感染第一型登革病毒，病毒株來源為 2011-2012 年在台南市造成大流行的美洲病毒株；另一 DENV-1 病毒株，來源為馬來西亞，在屏東縣新埤鄉造成小波流行。三株 DENV-2 中，其中一株來源為印尼，主要流行於屏東縣潮州鎮；另一株病毒株，主要流行於屏東縣屏東市及高雄市，造成較大的流行，來源亦為印尼。此外還有一株流行於台南市，來源為新加坡。屏東縣新園鄉流行一株 DENV-3 病毒，來源亦為印尼。境外移入病例之感染國家以印尼最多，其次為泰國、菲律賓及馬來西亞。持續進行病毒的監測，及早發現病毒，加強防治工作，可降低流行的幅度，避免登革熱在台灣本土化，並減少登革出血熱的發生率。

日本腦炎是由日本腦炎病毒感染所引起的急性傳染病，流行於亞洲地區，也是台灣的地方性傳染病。台灣於 1968 年起開始實施預防接種後，病例就開始急速下降。在日本腦炎病毒方面，1990 年以前，第三基因型病毒株 (genotype III; GIII) 是亞洲地區最主要的流行株，但其後漸漸被第一基因型 (genotype I; GI) 病毒株所取代，在許多國家如日本、越南、韓國、泰國及中國，已成為主要的日本腦炎病毒基因型。我國的日本腦炎病毒監測結果顯示，台灣地區 2007 年以前分離之病

毒株均屬於 GIII，但 2008 年開始在台灣北部分離出少數 GI 病毒株。台灣在 2009-2012 年間所分離出之日本腦炎病毒株已大部分屬於 GI，只有少數 GIII 病毒株被發現。在 2013 年日本腦炎病毒監測中，只偵測到 GI 病毒，顯示台灣的 GIII 病毒株已被 GI 病毒株所取代。病毒基因序列分析顯示，台灣 GI 病毒株的來源可能為中國大陸及日本。台灣日本腦炎病毒基因型的改變是否會影響疫苗的保護力及日本腦炎的發生率，仍有待繼續研究。

**關鍵詞：**病媒病毒傳染病、監測、登革病毒、日本腦炎病毒

## 英文摘要

Dengue and Japanese encephalitis are the most important vector-borne infectious diseases in Taiwan. Dengue is not considered endemic in Taiwan and constant importation of DENVs from the neighboring country is responsible for the local outbreaks each year. Because of the low mosquito density in the winters, outbreaks during winter were rare. However, there are a few overwinter outbreaks occurred in Taiwan. In 2013, a total of 6 epidemic dengue virus strains (2 DENV-1, 3 DENV-2 and 1 DENV-3) were identified during epidemic season in Taiwan. The first dengue outbreak began in Chunri Township, Pingtung County, on April and was caused by a strain of DENV-1 which is the same strain of virus that caused an overwinter outbreak in Tainan City during 2011-2012. Another outbreak caused by a DENV-2, began in Pingtung City and later spread to Kaohsiung City. This strain is closely related to the strains from Indonesia. An outbreak occurred in Tainan City that is also caused by a DENV-2 strains, which is closely related to the virus strains from Singapore. Imported dengue cases were arriving from 16 countries in Taiwan in 2013. Indonesia, Thailand, the Philippines and Malaysia are the most frequent importing countries. Imported dengue viruses are representative of the overall patterns of serotype frequencies of dengue outbreaks that occurred in Taiwan.

Japanese encephalitis (JE) is wide spread in Asia and is endemic in Taiwan. Since 1968, Taiwan has implemented a comprehensive early childhood JE vaccinations and the confirmed cases quickly dropped to about 10-37 cases per year. During the past two decades, the age of JE confirmed cases had an increasing trend, suggested that Taiwan's environmental factors, mosquito ecology, age related immunity of JE virus (JEV) has changed. Virological surveillance showed that the genotype III

(GIII) strains of JEV was the predominant epidemic strains circulating in Asia before 1990, however, the genotype I (GI) strains have been introduced into China, Japan, Vietnam, South Korea, and Thailand, and cocirculated with or replaced the GIII strains. Our surveillance data in 2013 showed that all of the JEV strains isolated in Taiwan belonged to GI (Taipei City, Taichung City, Tainan City and Chiayi County). This is in contrast to JEV isolates obtained during 2005-2007, when all of the JEV strains belonged to GIII. And during 2008-2009, only a few JEV strains belonged to the GI (Guandu Nature Park, Taipei City; pig farms in Wujie Township, Yilan County, and Wufeng Township, Taichung City). Overall, our results showed that genotype of JEV strains in Taiwan has shifted from GIII to GI over the last few years.

**Keyword :** vector-borne infectious disease, surveillance, Dengue virus, Japanese encephalitis virus

## 前言

登革熱與日本腦炎是台灣最重要的病媒病毒傳染病(1-5)。登革及日本腦炎病毒皆屬於黃病毒科(Flaviviridae)，黃病毒屬(Flavivirus)的病毒。黃病毒為單股正向 RNA 病毒，全長約 11 kb，基因體結構除了 5' 與 3' 端的非轉譯區外，轉譯區依序可分為 3 個結構基因(包含 C, prM/M, E) 與 7 個非結構基因(包含 NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) 共 10 個基因(6)。登革病毒依血清學反應可區分為第一~四型不同血清型別。在全球每年約有五千萬至一億人受登革病毒感染，五十萬人因登革出血熱住院，25,000 人因而死亡。登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，尤其是與台灣經貿、旅遊關係密切的東南亞國家，包括印尼、越南、泰國、菲律賓及馬來西亞等，都是登革熱盛行的地區。登革病毒主要由埃及斑蚊所傳播，其次是白線斑蚊。埃及斑蚊在台灣分佈於北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。登革熱雖然並非台灣本土性的流行疾病，但每年均有大量的境外病毒移入，近而造成本土的疫情(1-4)。故需持續進行病毒的監測，及早發現病毒，加強防治工作。

在登革病毒的流行病學研究方面，可利用分子生物學及病毒基因序列親緣性分析方法追蹤病毒的來源及擴散情形。1990 年 Rico-Hess 發表以 E-NS1 交接處 240 bp 的序列，分析收集自不同時間地點的第一型與第二型登革病毒，這是首次利用基因序列將登革病毒在血清型下再次分為不同基因型別(genotype)(7)；之後隨著分子生物技術與親緣性分析方法的快速發展，學者們陸續建構各種以不同基因片段為分析範圍的分子流行病學研究。其中最常見的是以 E(外套膜)基因為分析範圍，主要是因為外套膜蛋白上有病毒與細胞受器結合的抗原決定位置，也是中和抗體反應的決定位置，一般認為會比其他基因片段承受比較大的選擇壓力(selection pressure)。根據研究結果也發現，E 基因的變異的確與

病毒性狀的改變相關 (8)，而且以 E 基因序列建構的親緣樹 (phylogenetic tree) 最能反映病毒株的地理分布情形 (9)。本計畫建置之登革病毒基因資料庫，將有助於了解登革病毒在東南亞地區的演化情形，及分析本土流行病毒株的可能來源及擴散情形，作為緊急防治上的參考。

日本腦炎的流行區包含了大部份的亞洲地區、西太平洋島嶼及澳洲北部，也是亞洲地區最重要的病毒性腦炎傳染病。每年約有 35,000 至 50,000 人感染日本腦炎，造成約 10,000-15,000 人死亡。由於日本腦炎是經由病媒蚊的傳播，所以疫情的流行與氣候及季節兩大因素有關 (10)。在熱帶地區，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；但在溫帶及亞熱帶地區，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、臺灣及中國大陸的病例已減少很多，但鄰近的許多國家，包括菲律賓、印尼、馬來西亞、印度、尼泊爾等國都有許多日本腦炎患者，也常有流行的發生。

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*)、白頭家蚊 (*C. fuscocephala*)、尖音家蚊 (*C. pipiens*)、東鄉斑蚊 (*Aedes togoi*)、白吻家蚊 (*C. vishnui*) 和環喙家蚊 (*C. annulirostris*) 等均能媒介此病 (11)。流行初期病毒利用動物→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 (12)。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。1955 年，日本腦炎被列入報告傳染病，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。目前，每年的確定病例數都在 10 至 37 例間，成為可以控制的傳染病。

在日本腦炎病毒分子流行病學研究方面，依據 E 基因親緣性分析可將日本腦炎病毒分成 5 種基因型別，即 Genotype I-V (13-15)，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 20 年間各國的監測研究資料顯示，Genotype I 病毒株已陸續傳播至中國、日本、越南、韓國、和泰國 (16-19) 等地，並逐漸取代 Genotype III 病毒株。最近，Nabeshima 等人報告 Genotype I 病毒株常自東南亞和東亞大陸引進日本 (20)，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隨風遷移並傳播病毒、候鳥的遷徙等。

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 partial C/preM 基因進行親緣性分析，發現所有病毒株皆屬於 Genotype III，並可分成 3 個 clusters (21)。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，首次發現有 2 株病毒屬於 Genotype I (台北市關渡自然公園及宜蘭縣五結鄉養豬場) (5)。2009 年，又在台北市及台中縣霧峰鄉分離到 Genotype I 病毒；2009 年宜蘭縣與花蓮縣所分離到的病毒則仍屬於 Genotype III。2010 年則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）。由 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。監測結果也顯示 Genotype I 日本腦炎病毒已經引進台灣地區，並已逐漸取代 G III 成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型。

綜合來看，台灣現行的疫苗株（Genotype III 中山株或北京株）屬於古老病毒株（cluster 3），在 G I 病毒株引進台灣且快速的取代原有的 G III 後，GI 在 E 基因序列上與 G III 病毒株有更大之差異，所以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。本計畫持續日本腦炎病媒蚊監測。病媒蚊監測之優點：(一)可提供不同種類病媒蚊之日本腦炎病毒感染率；(二)相較於在人類及豬隻的日本腦炎病毒之低分離率，從病媒蚊檢體中，病毒分離的陽性率很高。本研究我們分離出 2013 年台灣具有代表性的本土流行病毒株，探討台灣本土流行的病毒之遺傳學和抗原性變化，建立基因資料庫及流行病學基本資料，提供未來疫苗評估及開發之參考。

## 材料與方法

1. **病患檢體及病毒株來源**：血清檢體來源為通報自疾管署之各種病媒病毒傳染病確定病例血清。病毒來源為疾管署歷年自行分離或購自 ATCC 之各種病媒病毒株。登革病毒及日本腦炎病毒之標準株(prototype)或疫苗株病毒係購自 ATCC。
2. **登革病毒及日本腦炎病毒分離**：登革及日本腦炎病毒株係由急性期確定病例血清或病媒蚊研磨液經由 C6/36 蚊蟲細胞株體外細胞培養方法所分離，病毒的鑑定使用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，或使用 Real-time RT-PCR 分離之病毒及其血清型。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。
3. **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：
  - (1) 5-7 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。
  - (2) 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，採集到的病媒蚊放入一般紙杯中帶回實驗室，分類及記錄採獲蚊子數。
  - (3) 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。將蚊子 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，再離心得到上清液，取上清液進行 RNA 抽取及 RT-PCR 篩檢日本腦炎病毒陽性檢體。
4. **病毒核酸之抽取及純化**：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。病人血清檢體或每一蚊子 pool 的研磨上清液取 140  $\mu$ L，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)。

5. **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。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'-GCCATATGGT ACATGTGGCT GGGAGC-3' ; 60 nM FL-R3: 5'-GTKATTCTTG TGTCCCAWCC GGCTGTGTCA TC-3' ; 60 nM FL-R4: 5'-GTGATGCGRG TGTCCCAGCC RGCKGTGTCA TC-3' 。 (2) **JEV-specific**: 200 nM JE3F1: 5'-CCCTCAGAAC CGTCTCGGAA -3' ; 200 nM JE3R1: 5'-CTATTCCCAGGTGTCAATATGCTGT-3' 。 (3) **JEV GIII-specific primers**: 200 nM E12F: 5'-CTGGGAATGGG CAATCGTG-3' ; 200 nM E325R: 5'-TGTC AATGCT TCCCTTCCC-3' 。
6. **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 Mx3000 quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, California, USA)。詳細的檢驗方法如以前的研究敘述 (22)：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。
7. **核酸定序及分析**：對於具有代表性的分離病毒株，以病毒培養液為材料，進行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，登革病毒定序用之引子如以前的研究敘述 (3,4)。表一為日本腦炎病毒結構基因的定序所用的引子。以 DNA Star、Clustal W software、MEGA version 5 (<http://www.megasoftware.net/>) 進行核酸序列比對及演化親源性分析。

## 結果

- 1. 2013 年台灣地區登革熱本土流行之分析結果：**延續 2012 年的登革熱流行，2013 年 1 月在台南市及高雄市各有 8 例及 5 例登革熱確定病例，2 月在台南市有 2 例確定病例，3 月在高雄市有 1 例確定病例。2013 年從 4 月開始登革熱進入流行季，4-11 月 15 日止共有 6 株病毒在台灣流行(圖一)。4 月在屏東縣春日鄉開始發生小規模的登革熱流行，流行病毒株 DENV-1 的 E gene 核酸序列與 2011-2012 年在台南市流行的 DENV-1 美洲病毒株序列相同(圖二)，此波流行共有 36 例確定病例，流行至 7 月結束。屏東縣新埤鄉在 8-10 月間出現散發病例，在病人檢體中分離出 DENV-1，病毒的核酸序列與馬來西亞病毒株最相似(圖二)。6 月開始在屏東縣潮州鎮及其鄰近鄉鎮發生較大規模的流行，流行的病毒株為 DENV-2，其核酸序列與印尼病毒株最相似(圖三)，至 11 月上旬有約 40 例確定病例被檢測出。另一 DENV-2 病毒株自 7 月起在屏東縣屏東市及萬丹鄉，高雄市鳳山區等亦造成較大規模的流行，11 月上旬已有約 120 例確定病例被檢測出，此病毒株之核酸序列與印尼病毒株最相似(圖三)。在 10 月時，台南市出現小波流行，分離出一新的 DENV-2 病毒株，其核酸序列與新加坡病毒株最相似(圖三)。此外，屏東縣新園鄉在 5 月起亦出現小規模流行，分離出一 DENV-3 病毒株，其核酸序列比對與印尼病毒株最相似(圖四)。至 11 月 15 日止，台灣共有 273 例本土登革熱確定病例。
- 2. 2013 年 1 月至 11 月 15 日止，台灣共有 232 例境外移入登革熱確定病例。**境外移入登革熱確定病例主要的感染國家依次為印尼(69 例)、泰國(59 例)、菲律賓(31 例)、馬來西亞(17 例)、越南(13 例)、印度(10 例)等，其中 95 例(占 41.3%)是由機場篩檢出來。DENV-1 之境外移入病毒中，有一株來自中國，屬於 genotype I，與菲律賓病毒株最相似；另有

一株來自斯里蘭卡，屬於 genotype I，與緬甸病毒株最相似。有 2 株來自新加坡，屬於 genotype III，與馬來西亞病毒株最相似；genotype III 病毒株似乎有在東南亞加速散播的趨勢(圖二)。DENV-2 之境外移入病毒中，主要來自印尼及泰國。今年在本土流行的 2 株 DENV-2 均與境外移入印尼病毒株極為相似(圖三)。DENV-3 之境外移入病毒中，有一株來自所羅門群島，屬於 genotype I，與印尼病毒株最相似；DENV-3 genotype III 病毒株也有在東南亞加速散播的趨勢(圖四)。DENV-4 之境外移入病毒中，菲律賓病毒株數量最多；有一株來自中美洲聖露西亞，屬於 genotype II，特別的是它與印尼病毒株最相似(圖五)。

3. **日本腦炎病媒蚊採集及日本腦炎病毒 Envelope protein (E) 基因的親緣性分析：**為了瞭解台灣日本腦炎病毒株的基因特性，我們分別在北中南東各地區採集病媒蚊，共得到 17,961 隻病媒蚊，分為 406 池 (pool)，以 RT-PCR 篩選 JEV 陽性檢體，並進行日本腦炎病毒分離(圖六)。共有 58 池為 JEV 陽性，分離出 37 株日本腦炎病毒。圖七為分離出之日本腦炎病毒進行 E 基因定序及演化親緣性分析結果。2013 年間所分離到的日本腦炎病毒株全部屬於 GI，未分離出 GIII 病毒株。分離出之日本腦炎病毒株可將其分為二個族群 (Cluster)。Cluster 1 病毒株分佈於台灣中南部地區，與中國大陸、越南、日本病毒株相似。Cluster 2 包含較多的病毒，分佈於全台灣，與中國大陸及日本的病毒株最相似。表三綜合 2005-2013 年日本腦炎病毒基因型在台灣的分佈，顯示台灣的日本腦炎病毒的基因型別已由 GIII 變成 GI。

## 討論

2013 年截至 11 月 15 日為止，台灣地區共有 273 例登革熱本土病例，1-3 月間雖只有 16 例本土確定病例，但顯示冬季期間，雖然病媒蚊密度低，但仍有病毒持續傳播，至 4 月時，屏東縣春日鄉開始爆發流行，流行的病毒株與 2011-2012 台南市流行的病毒株相同。此病毒株為 DENV-1 genotype III 登革病毒，屬於美洲病毒株，已在台灣南部跨越 2 個冬季，造成連續 3 年的流行。雖然至 2013 年 7 月止，這波流行已結束，但仍應加強病媒蚊防治，避免登革熱成為本土化疾病。今年(2013 年)台灣本土登革熱流行的主要地區在屏東縣，共偵測出 5 株病毒在屏東縣流行，包括 2 株 DENV-1, 2 株 DENV-2, 及 1 株 DENV-3, 分別來自於台灣南部(美洲病毒株)、馬來西亞、印尼、印尼、印尼。其中一株 DENV-2 病毒株，首先在屏東市造成流行，而後漸擴散至鄰近鄉鎮及高雄市，目前疫情仍在升溫。比較今年(2013 年) 同期登革熱本土病例雖為近 5 年來最低，但仍處於流行季高峰，南部地區仍應加強病媒蚊防治。

比較今年(2013 年) 同期登革熱境外移入病例，則比 2011-2012 為高，截至 11 月 15 日止，共有 232 例境外移入病例。共來自 16 個國家，其中以印尼最多(69 例，包含 1-3 型登革病毒)；泰國次之(59 例，包含全部 4 型登革病毒)；其次為菲律賓 (31 例)；馬來西亞(17 例)及越南 (14 例)。DENV-1 genotype III 與 DENV-3 genotype III 在東南亞有擴散的現象。另外也首度分離到巴西 DENV-4 病毒株及聖露西亞 DENV-3。比較本土流行的病毒株與境外移入病毒株顯示，台灣流行的病毒株與東南亞流行的病毒株親緣關係密切，特別是與台灣高度經貿往來及交流的國家。

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，1990 年以前，Genotype III 病毒株一直是亞洲主要的流行株。然而，在過去 20 年間 Genotype I 病毒株已陸續傳播至中國、越南、日本、韓國、泰國等地，並逐漸取代 Genotype III 病毒株。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 2008 以前的病毒屬於 Genotype III。2008 年間，我們首度在溼地及其附近豬舍(台北市北投區關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場)發現 Genotype I 日本腦炎病毒株。JEV GIII 的病毒在 2009-2012 年間快速減少，甚至消失。至今年(2013 年)發現台灣大部分地區之日本腦炎病毒株皆屬於 Genotype I (台北市、台中市、台南市、嘉義縣)，顯示台灣地區日本腦炎病毒隨著年代而改變，GIII 病毒已幾乎消失，被 GI 病毒所取代。



## 結論與建議

由於交通便捷及氣候變遷等因素，各種新興與再浮現病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，對人類健康所造成的威脅日益嚴重，建立一套完整的病媒性傳染病監測系統是十分重要的。藉由實驗室為基礎的病毒學即時監測系統，建立登革與日本腦炎病毒基因資料庫，應用於病毒親緣性關係分析，以瞭解本土流行病毒株之來源、擴散及分布情形及新病毒之引進情形，可以對流行疫情的現況與防治工作提供重要的資訊。未來仍應加強機場發燒篩檢等主動監測系統，及時篩檢出有傳播力的病患，減少病原體之境外移入。建立完整的病原體基因資料庫是一種重要的資產，對於疫苗與治療藥物開發，致病機轉了解及研究都提供極有用的資訊。日本腦炎病毒方面，在 2005-2013 年間，我們監測出台灣的日本腦炎病毒由 Genotype III 轉變為 Genotype I，並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，可提供未來疫苗改進、開發及評估之參考。

開發登革熱疫苗應是防治登革熱最有效的方法，但在疫苗尚未問市之際，清除蚊蟲孳生源仍為防治登革熱最主要的方法。而台灣登革熱流行主要的原因是由於每年由鄰近東南亞國家引進大量的登革病毒，加以台灣的病媒蚊密度除了在冬季溫度降至 15°C 以下時較低之外，其他季節皆適合病媒蚊孳生，故登革熱易在人口聚集及病媒蚊密度高的地區造成流行。目前疾管署在機場所實施之發燒篩檢可檢驗出 40-50% 境外移入登革熱病例，為一種有效的降低境外病毒引進的方法。但仍有許多境外移入登革熱病例，因處於潛伏期或非病毒血症期，以致未能在機場篩檢出，這些境外移入病例在國內發病後，如未採取適當的隔離措施，極有可能被病媒蚊叮咬因而造成流行。由過去研究發現，台灣在流行季節及流行地區內，帶登革病毒的蚊子比例極低，

不容易偵測，故登革熱流行的早期監測，仍以登革熱病例的監測為主。所以登革熱病人的主動發現及醫師的早期通報，及早發現病例並進行防治工作，對登革熱疫情的控制有很大的幫助。疾管署實驗室可提供快速的監測及檢驗報告，並開發登革熱快速檢驗試劑，縮短檢驗時間，有助於及早發現病例，降低登革熱的流行。

今年屏東縣登革熱個案較高雄市多，可能的原因包括：(1) 今年共發現有六株登革病毒株在台灣流行，其中就有五株病毒最早在屏東縣流行。2013年4月時，屏東縣春日鄉即開始爆發 DENV-1 流行，此病毒株與 2011-2012 台南市流行的病毒株相同，顯示冬季期間，雖然病媒蚊密度低，但仍有病毒持續傳播。此病毒株已在台灣南部跨越 2 個冬季，造成連續 3 年的流行。雖然至 2013 年 7 月止，這波流行已結束，但仍應加強病媒蚊防治，避免登革熱成為本土化疾病。除春日鄉流行的病毒株為越冬流行外，其他病毒株來源均為今年境外移入之病毒。屏東縣新埤鄉流行的 DENV-1 病毒株，來源為馬來西亞；屏東縣潮州鎮流行的 DENV-2，來源為印尼；此外，屏東市流行的 DENV-2 病毒株，以及屏東縣新園鄉流行的 DENV-3 病毒株，來源亦均為印尼。近年來，印尼登革熱疫情嚴重，已成為台灣最主要的境外移入登革熱病例的來源國家。今年屏東縣可能有較多境外移入的登革熱病例，尤其是來自印尼及馬來西亞，因而流行較為嚴重。(2) 屏東縣地處台灣最南部，氣候溫暖，極適合病媒蚊孳生。部分地區如屏東市、潮州鎮等，因病媒蚊密度高且人口密集等因素，一旦疫情爆發，防治工作加倍困難。近年來，屏東縣並未發生較大規模的疫情，故在病例的通報、防疫工作的動員及防疫人員的經驗與訓練等，與高雄市比較，可能有所不足。此外也因近年來屏東縣未有大規模的疫情，故人民普遍缺乏對疾病的免疫力，可能也是病毒能快速傳播的原因之一。

## 計畫重要研究成果及具體建議

### 1. 計畫之新發現或新發明

2013年4-11月間共有6株登革病毒(2株DENV-1、3株DENV-2及1株DENV-3)在台灣流行,主要發生在屏東縣市。首例出現於屏東縣春日鄉,感染第一型登革病毒,病毒株來源為2011-2012年在台南市造成大流行的美洲病毒株;另一DENV-1,來源為馬來西亞,在屏東縣新埤鄉造成小波流行。三株DENV-2中,其中一株來源為印尼,主要流行於屏東縣潮州鎮;另一株DENV-2病毒株,主要流行於屏東縣屏東市及高雄市,造成較大的流行,來源亦為印尼。此外還有一株DENV-2流行於台南市,來源為新加坡。屏東縣新園鄉流行一株DENV-3病毒,來源亦為印尼。境外移入病例之感染國家以印尼最多,其次為泰國、菲律賓及馬來西亞。持續進行病毒的監測,及早發現病毒,加強防治工作,可降低流行的幅度,避免登革熱在台灣本土化,並減少登革出血熱的發生率。

日本腦炎是由日本腦炎病毒感染所引起的急性傳染病,流行於亞洲地區,也是台灣的地方性傳染病。我國的日本腦炎病毒監測結果顯示,台灣地區2007年以前分離之病毒株均屬於GIII,但2008年開始在台灣北部分離出少數GI病毒株,在2009-2012年間所分離出之日本腦炎病毒株已大部分屬於GI,只有少數GIII病毒株被發現,顯示GI病毒株已逐漸取代GIII,成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型。在2013年日本腦炎病毒監測中,只偵測到GI病毒,顯示台灣的GIII病毒株已被GI病毒株所取代。病毒基因序列分析顯示,台灣GI病毒株的來源可能為中國大陸及日本。台灣日本腦炎病毒基因型的改變是否會影響疫苗的保護力及日本腦炎的發生率,仍有待繼續研究。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

相關單位在舉辦研討會及教育訓練時,應將登革熱與日本腦炎感染之臨床特徵及檢驗方法納入宣導及教育內容。境外移入登革熱確定病例逐年上升,其中很多是無症狀、無發燒之空窗期患者,需要其他監測系統配合,應加強衛教宣導、鼓勵病人自我通報及加強醫師通報等。加強衛教宣導,強調現有日本腦炎Nakayama疫苗能提供具保護力的中和抗體,鼓勵幼兒按計畫施打疫苗。對高年齡的民眾,若有需要,可考慮再施打疫苗,降低感染的風險。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

因應未來氣候變遷,台灣地區可能發生病媒性傳染病的共同流行(如登

革熱、日本腦炎及屈公病等)。應加強監測，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. Characteristics of dengue epidemics in Taiwan. Chang SF, Huang JH, Shu PY. *J Formos Med Assoc.* 2012;111:297-9.
2. Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:349-58.
3. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:903-9.
4. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:1039-46.
5. Huang JH, Lin TH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Lu LC, Lin C, Yang CF, Chang SF, Liao TL, Yu SK, Cheng CH, Chang MC, Hu HC, Shu PY. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:876-8.
6. Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 649-688. Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev.* 14:197-221.
7. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in Nature. *Virology* 1990; 174: 479-493.
8. Cologna R and Rico-Hesse R. American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells. *J Virol.* 2003; 77: 3929–3938.
9. Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;31:266-72.
10. Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol Rev.* 14:197-221.
11. Hu SMK, Grayston JT. 1962. Encephalitis on Taiwan II. Mosquito Collection and Bionomic Studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 11 : 131-140.
12. Wu YC, Huang YS, Chien LJ, Lin TL, Yueh YY, Tseng WL, Chang KJ, and Wang GR. 1999. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am J Trop Med Hyg* 61, 78-84.
13. Williams DT, Wang LF, Daniels PW, Mackenzie J S. 2000. Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus,

- the FU strain. *J Gen Virol* 81, 2471–2480.
14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  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. 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.
  20. 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 Virol.* 90:827-32.
  21. 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.
  22. 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.

**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.****The distribution of imported dengue viruses in 2013  
(2013/01/01-2013/11/11)**

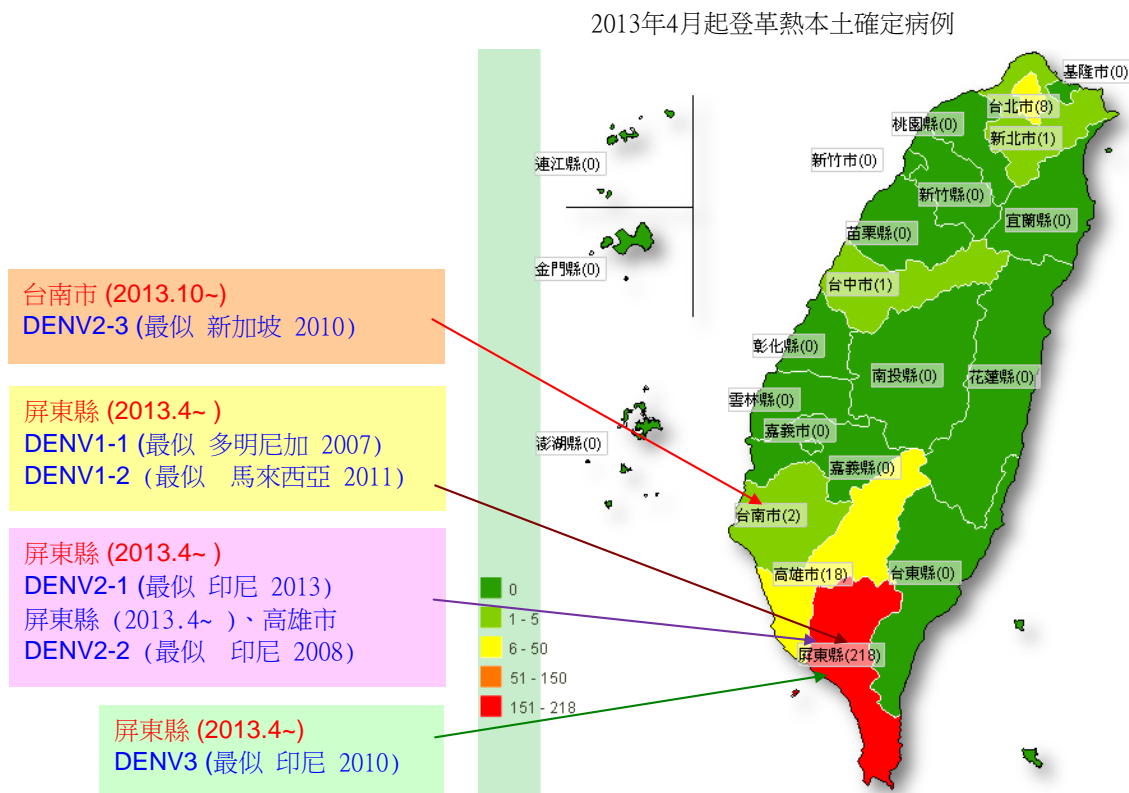
Country	Case	Fever screening	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Subtotal
Indonesia	69	28	15 (13)	10 (9)	10 (8)	-	35 (30)
Thailand	58	20	13 (11)	10 (8)	2 (2)	3 (3)	28 (24)
Philippines	31	12	3 (3)	4 (2)	1 (1)	7 (6)	15 (12)
Vietnam	13	8	2 (2)	3 (3)	2 (1)	2 (1)	9 (7)
Malaysia	17	11	9 (7)	3 (3)	1 (1)	-	13 (11)
Myanmar	9	3	4 (3)	2 (2)	-	-	6 (5)
Singapore	5	3	3 (3)	1 (1)	-	-	4 (4)
Cambodia	7	1	2 (2)	-	-	-	2 (2)
India	10	7	2 (2)	6 (3)	1 (1)	-	9 (6)
China	3	-	1 (1)	-	-	-	1 (1)
SriLanka	2	-	1 (1)	-	-	-	1 (1)
Lao	2	-	1 (0)	-	-	-	1 (0)
Solomon Islands	1	-	-	-	1 (1)	-	1 (1)
Brazil	1	1	-	-	-	1 (1)	1 (1)
Fiji	1	-	-	-	-	-	-
Saint Lucia	1	1	-	-	-	1 (1)	1 (1)
Total	230	95	56 (48)	39 (31)	18 (15)	14 (12)	127 (106)



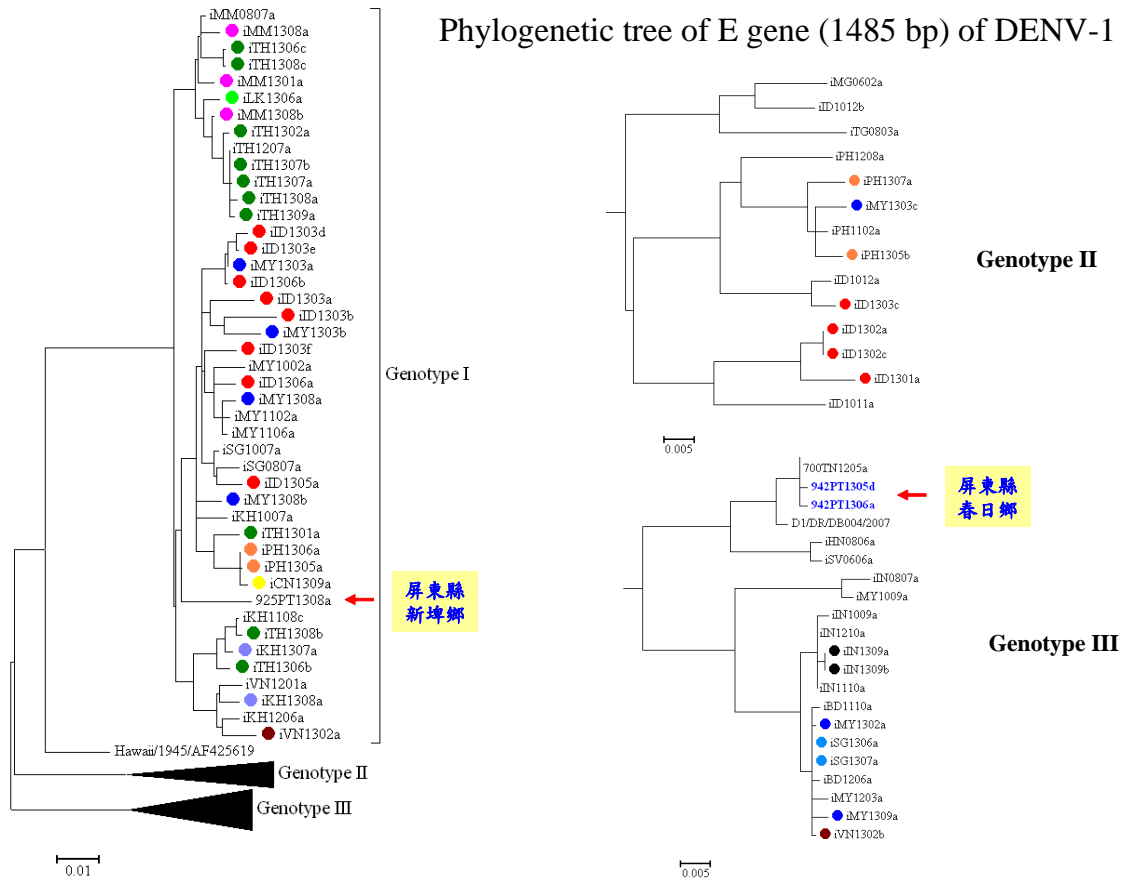
**Table 3. Geographic distributions of JEV genotypes in Taiwan, 2005-2013**

Locality	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Taipei City	nd	nd	GIII	GI GIII	GI	GI	GI	GI GIII	GI
Taichung City	GIII	GIII	nd	GIII	GI	GI GIII	GI	GI	GI
Tainan City	nd	nd	GIII	nd	nd	GI	nd	GI	nd
Kaohsiung City	GIII	nd	nd	nd	nd	GI GIII	nd	nd	GI
Yilan County	GIII	GIII	nd	GI GIII	GIII	GI	GI	GI	GI
Hualien County	GIII	GIII	GIII	GIII	GIII	GI	nd	GI	nd

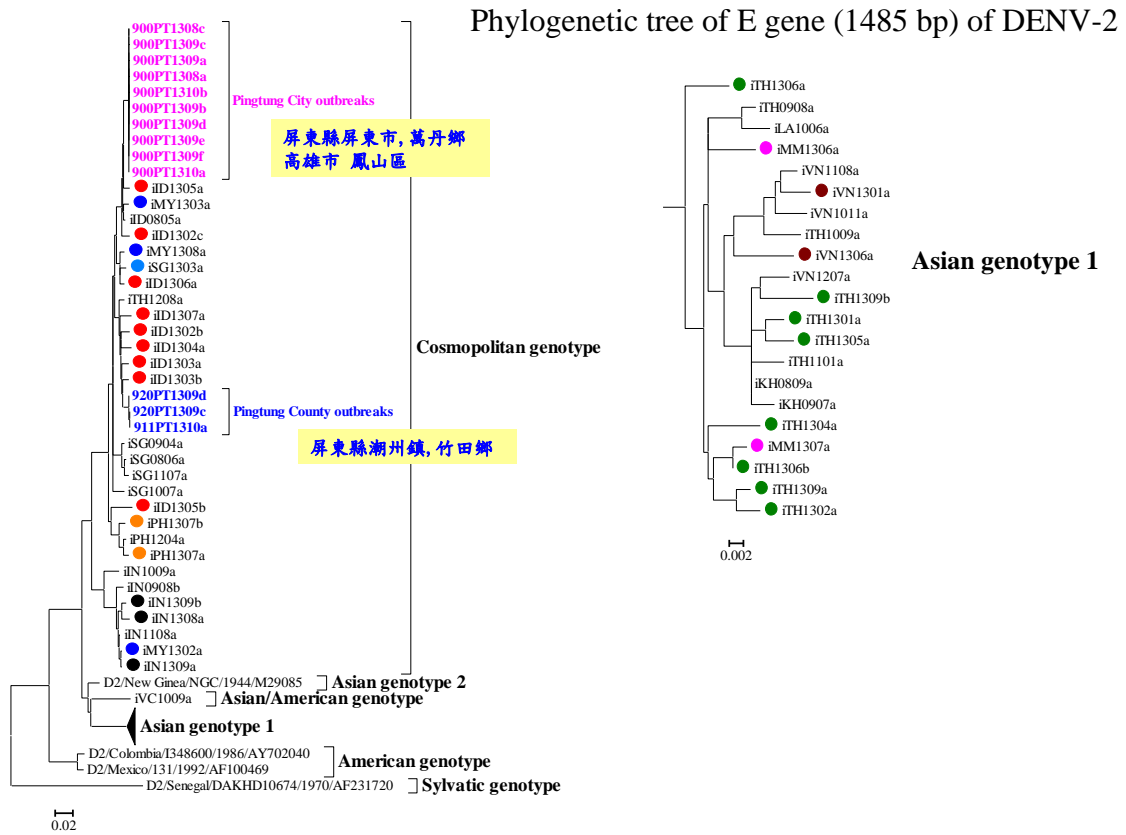
**Figure 1**



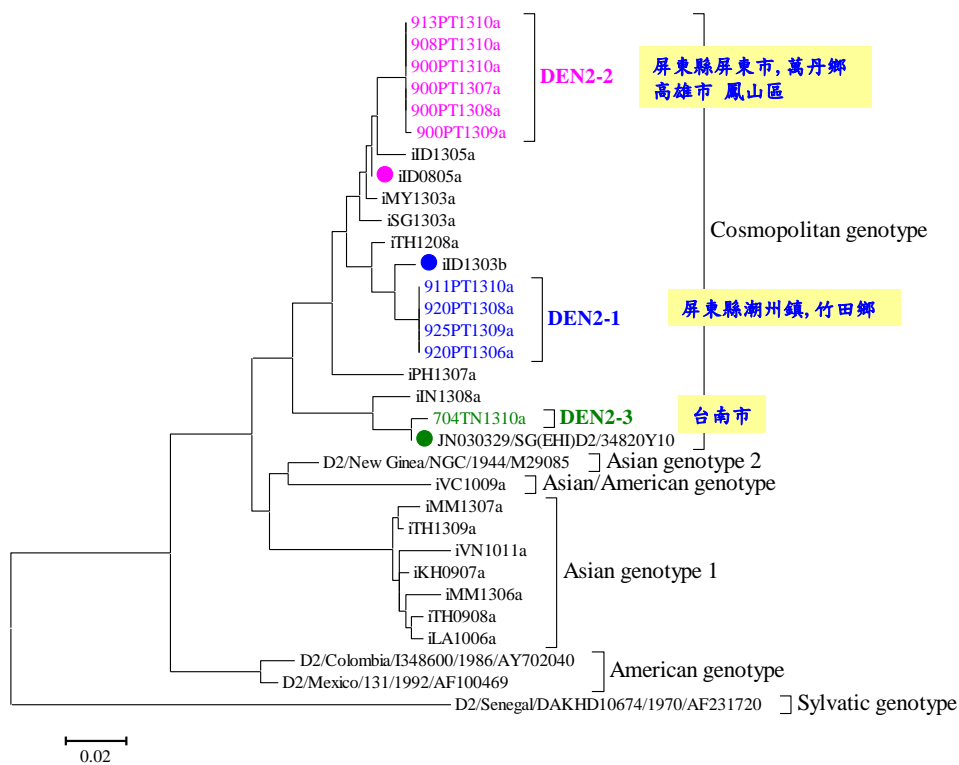
**Figure 2.**



**Figure 3.**

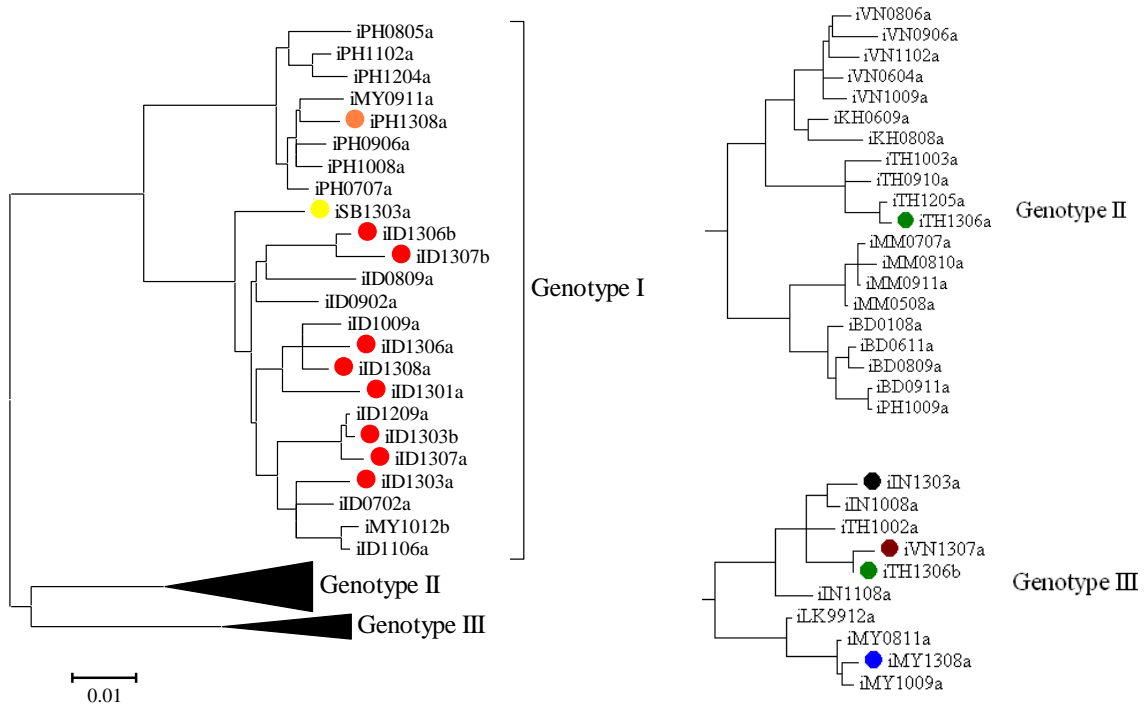


**Phylogenetic tree of partial E gene (534 bp) of DEN-2**

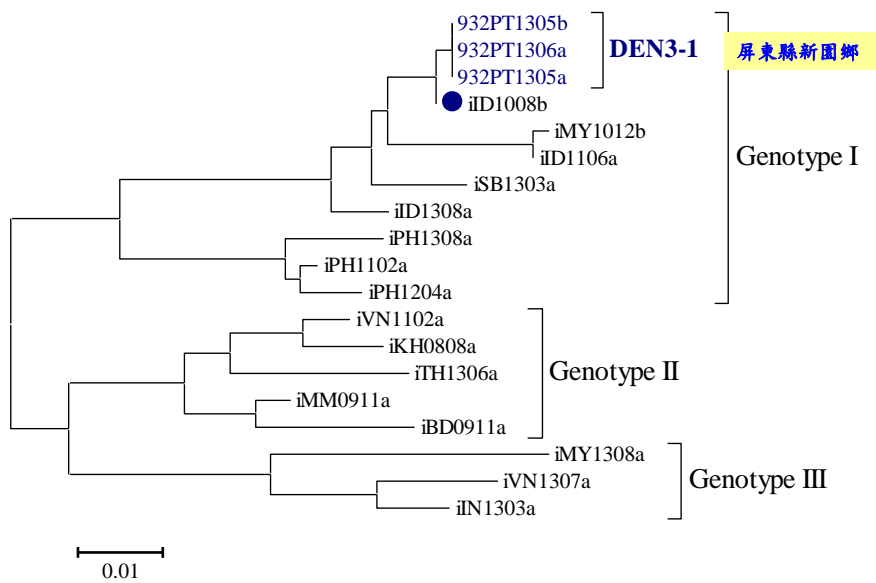


**Figure 4.**

Phylogenetic tree of E gene (1479 bp) of DENV-3



Phylogenetic tree of partial E gene (540 bp) of DEN-3



**Figure 5.**

**Phylogenetic tree of E gene (1485 bp) of DENV-4**

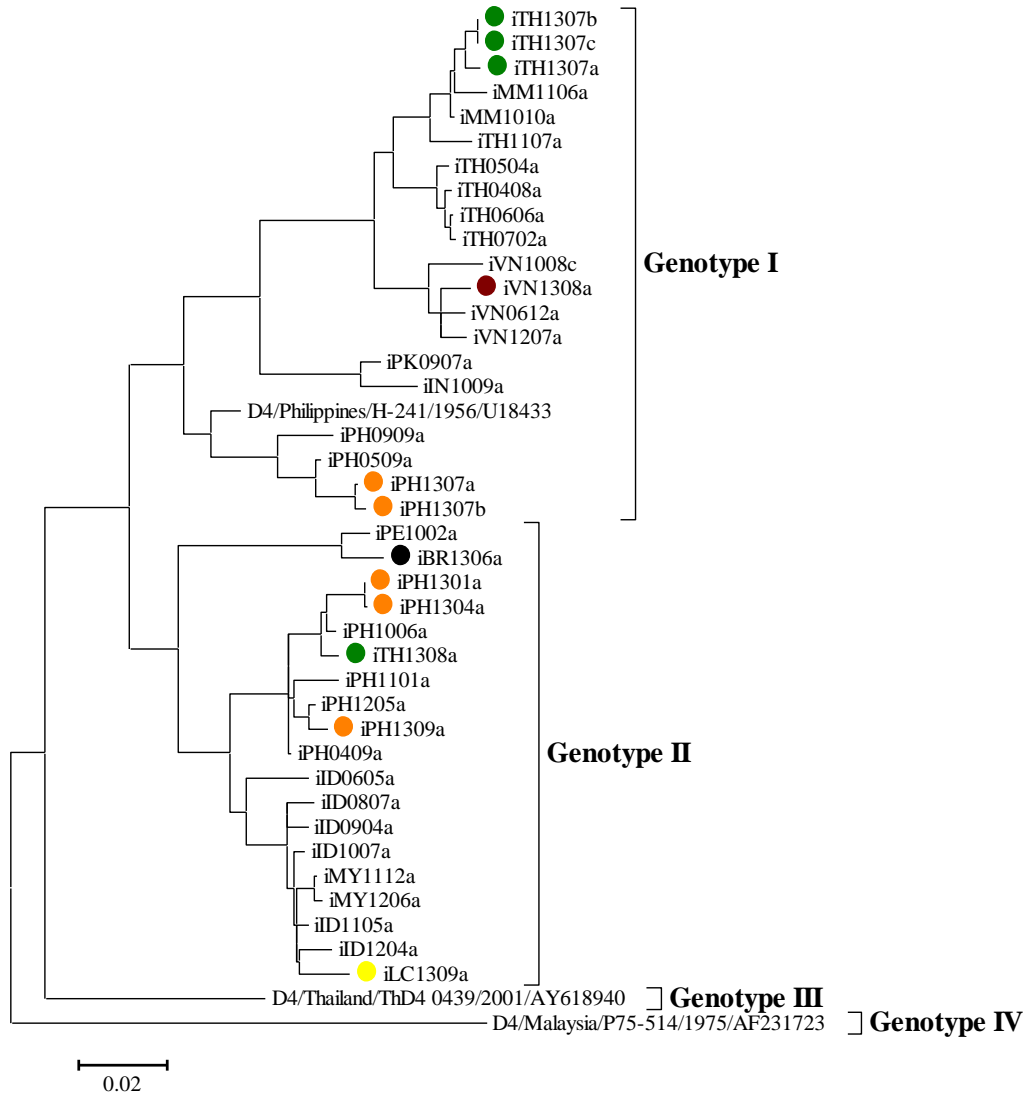
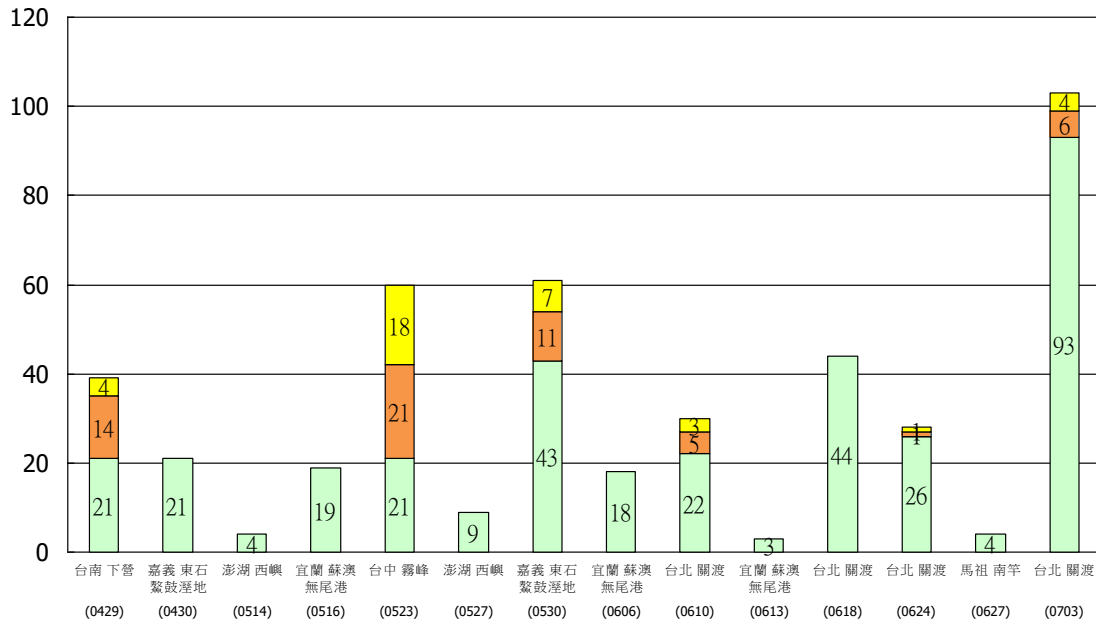


Figure 6.



		PCR陰性數	PCR陽性數	V.I陽性數	蚊子pool數
(0429)	台南 下營	21	14	4	35
(0430)	嘉義 東石 鰲鼓溼地	21			21
(0514)	澎湖 西嶼	4			4
(0516)	宜蘭 蘇澳 無尾港	19			19
(0523)	台中 霧峰	21	21	18	42
(0527)	澎湖 西嶼	9			9
(0530)	嘉義 東石 鰲鼓溼地	43	11	7	54
(0606)	宜蘭 蘇澳 無尾港	18			18
(0610)	台北 關渡	22	5	3	27
(0613)	宜蘭 蘇澳 無尾港	3			3
(0618)	台北 關渡	44			44
(0624)	台北 關渡	26	1	1	27
(0627)	馬祖 南竿	4			4
(0703)	台北 關渡	93	6	4	99
		348	58	37	406

**Figure 7. Phylogenetic analysis of JEV genotype III strains.**

