

計畫編號：DOH92-DC-1049

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

南台灣登革熱病毒之監測與分子 流行病學之分析

研究報告

執行機構：高雄醫學大學

計畫主持人：盧柏樑

研究人員：董宜青、江玟靜

執行期間：92年01月01日至92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
一. 中文摘要	(4-5)
二. 英文摘要	(6-7)
三. 計劃內容	
(一) 前言	(8-11)
(二) 材料與方法	(12-17)
(三) 結果	(18-23)
(四) 討論	(24-25)
(五) 參考文獻	(26-28)
(六) 圖表	(29-32)

摘要

有關登革熱之研究因此病之流行多發生於小於 15 歲之族群，所以較少有關於病人原有之疾病對登革熱影響之分析。因此對南台灣 2002 年 93.6% 為成年人之登革熱流行進行分析。以單一醫院一年內 311 位典型登革熱及 94 位登革出血熱為研究對象，發現糖尿病、慢性腎功能不全、及以往曾得過登革熱為得到登革出血熱之顯著因子 ($p=0.037, 0.025, 0.003$, respectively)。多變項分析顯示只有以往曾得過登革熱為唯一顯著因子 ($P=0.008$)。有九位死亡病例，糖尿病、慢性腎功能不全、及年齡大於 65 歲在單變項分析為與死亡相關之危險因子，多變項分析顯示只有慢性腎功能不全為唯一顯著因子。

關於病毒量之分析由於登革出血熱之連續性檢體只有五例，以有限之檢體和典型登革熱相比，在發病日第四天與第五天兩組之病毒量無顯著差異。有些患者發燒大於七日，以定量 PCR 仍可檢測到病毒。

這些分離株經核甘酸分析彼此差異是 0.4% 到 6.6%，且核甘酸變異多發生在 cordon 之第三個位置而屬於 silent mutation。氨基酸序列有二個發生變化。再與台灣歷年株及外國株比較，由 phlogenetic tree 分析可知民國 91 年分離株與

其他株有明顯的差異而屬於一獨立的基因群。

Abstract

The impact of the underlying diseases that were more commonly seen in adult population than children on disease severity of dengue infections was rarely reported for most of the dengue infected were younger than 15 years old in dengue epidemic areas. We conduct a prospectively observational, hospital-based study on 311 dengue fever (DF) and 94 dengue hemorrhagic fever (DHF) cases in a 2002 Taiwan dengue serotype 2 outbreak. Univariate analyses revealed the significant risk factors associated with DHF cases were patients with diabetes mellitus (DM), Chronic renal insufficiency (CRI), and histories of past dengue infection ($p=0.037$, 0.025 , 0.003 , respectively). Multivariate logistic regression analysis revealed past dengue infection was the only significant factor for DHF ($P=0.008$). Nine patients died from DHF. Patients with CRI, DM, or aged more than 65 years old were correlated with higher mortality rate in the results of the univariate analyses. Multivariate logistic regression analysis revealed CRI was the only significant factor for mortality. In summary, prior hetero-serotype dengue infection was the most significant factor of DHF during this outbreak when more than 90% cases were adults. Clinicians should notice dengue infected cases with underlying disease of DM or CRI might have higher possibility of DHF/DSS and that CRI was a significant risk factor for mortality.

The comparison of viral load at day 4 and day 5 did not reveal significant difference, however, the number of DHF cases with continuous blood samples is small. Some patient had fever more than 7

days were tested to be PCR positive with quantitative PCR.

The sequence of a 240-nucleotide-long region across the envelope/non-structural 1 protein (E/NS1) gene junction of the isolates were determined and analysed. Alignment and comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the isolates revealed that nucleotide changes occurred mostly at the third position of a particular codon. Two nucleotide changes resulted in amino acid substitutions. Pairwise comparisons of the nucleotide gave divergence values ranging from 0.4 to 6.6%. Comparison of the nucleotide sequences of the dengue isolates with those of other world revealed that the isolates in 2002 were obvious different from other strains. Phylogenetic tree shows that the isolates in 2002 were belonged to an independent genotype.

Key words : Dengue virus, Dengue hemorrhagic fever, Realtime PCR

計畫內容

一、前言：

登革熱是一種以斑蚊為媒介的重要傳染病，目前所知的媒介主要是埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)和白線斑蚊(*Aedes albopictus*)。由於斑蚊嗜生活在北迴歸線以南的溫熱型氣候，因此登革熱會在熱帶及亞熱帶國家造成流行，包括東南亞、南太平洋、非洲、中南美洲地區的國家，每年將近有四千萬的病例發生，已成為世界性的重要公共衛生問題了。(1)

登革熱病毒在分類上是屬於黃質病毒科(Flaviviridae)的黃質病毒屬(Genus Flavivirus)，依血清型可分為 1~4 型病毒。其基因組成是一條正性、單股的 RNA，外面由一正二十面體的 nucleocapsid 所包圍，而在 capsid 的外圍是由 envelope 所組成。(2)

感染登革熱病毒後典型的症狀有發燒、頭痛、全身性的疼痛、關節痛、肌肉痛、皮膚紅疹及伴隨淋巴、白血球的病變。出血性登革熱(Dengue hemorrhagic fever, DHF)是比較嚴重的情形，會引起不正常的出血及血管通透性增加，最嚴重的是會導致休克的症狀，稱為登革休克症候群(Dengue shock syndrome, DSS)，若沒有即時醫治，死亡率可達 40-50%。(3)

在台灣地區有關登革熱流行的記載，在 1915，1931 及 1942 年共有三次的大流行，後來的四十年間未曾有流行，直到 1981 年，小琉球爆發大流行，該島約 80%的人口都得到感染。當時的分離株為第二型病毒。(4-6)

在 1987 到 1988 年間，南台灣(包括高雄市、縣及屏東縣等)又有一次流行，當時的分離株多為第一型。接著幾年由於衛生單位防疫工作得宜，只有少數的病例報告。(7, 8) 而在 1944 年有 26 例第三型的本土株被分離。隔年(1955)第一型病毒也在台北造成流行。(9) 2002 年登革熱又在高雄縣市造成流行，目前確定病例已超過 1200 例，而分離株多為第二型病毒。值得注意的是四型登革熱病毒都已在台灣出現過，若是遭受到前後不同型病毒株的感染，可能由於免疫增強 (immune enhancement) 作用而增高導致出血性登革熱流行的機率。

臨床上用來診斷登革熱的方法包括病毒培養分離、血清學及分生技術。病毒分離部分是將病毒培養在 C6/36 蚊子細胞 7 天後再以間接免疫螢光測定。但由於需在急性期(發病 5 天內)採血，且檢體的輸送過程中易因溫度、時間等因素而使病原消失，且太耗時了，在臨床診斷與疫情監控上並沒有時效性。而血清學應用於登革熱診斷的方法有補體結合試驗(Complement fixation assay)、溶斑還原中和試驗

(Plaque reduction neutralization PRNT)、血球凝集抑制試驗 (Hemagglutination inhibition HI)(10,11)。這些方法都需要二次採血，但第二次採檢不易取得，且步驟繁瑣耗時。而 ELISA 可偵測 IgM，但通常是發病後 3~10 天才會出現所以在症狀期採的血不一定會出現 IgM。另外也有 Immunochromatographic test (IC test)可於極短時間內偵測到 IgG 及 IgM，(12) 但文獻報導以 IgM capture ELISA 的敏感度及特異性最好。(13,14) 因此若欲對登革熱檢驗作最迅速及正確的診斷就需倚賴如 RT-PCR 等分生技術了。(15-18) 而分生技術除了具高敏感度與特異性，又能快速診斷外，近二年來更有些可定病毒核酸量的分生技術(如 Realtime RT-PCR，NASBA 及 competitive RT-PCR 等)應用於登革熱之診斷。(19-24) 其中 Real-time RT-PCR 是目前偵測登革熱病毒感染最快速的方法，尤其在感染初期，病人血清中尚未出現 IgM 時，Realtime RT-PCR 除了可立即偵測外，又可同時鑑定出是何型的病毒。這對疾病治療方向與立即地做疫情監控措施是有其重要性與必要性的。另外欲探討登革熱感染與所造成的臨床症狀嚴重程度(如出血性登革熱)之關係，利用 Realtime RT-PCR 測病毒的核酸定量更是重要。

本研究即收集住院期間(高醫附設醫院感染科)及門診疑似登革熱感染病人的血清，利用 Realtime RT-PCR 之技術快速鑑定且定量登

革熱病毒。以進一步瞭解疾病發展及治療前後是否與病毒血症 (Viremia) 有關聯性。此計劃在登革熱盛行區(高雄縣市)執行，以提供臨床上最迅速結果對防治登革熱而言更顯其重要性與必要性。

另外，對這些疑似或確定登革熱之病人，除了臨床上一系列的檢驗外，本計劃將利用眼科檢查包括眼皮、結膜、角膜、前房、眼壓、玻璃體、黃斑部及視網膜其他區域等等。與內科臨床症狀配合分析，了解登革熱病人影響眼部併發症之潛在因子。目前國外報告有關登革熱之眼睛病變極少，(25) 國內僅有 1988 年溫國宏醫師等 24 例 30 隻眼睛之報告。(26) 鑒於登革熱流行情況愈熾。是否對病患之視力造成進一步影響。皆須再重新評估。

最後本研究還要分析這些鑑定出的病毒株之核甘酸序列的比較。可進一步得知基因變異情形。並與世界各國的基因加以比對根據其基因型變遷情況。進行分子流行病學與演化率之研究。

二、材料與方法

(一) 檢體之採集:

檢體之來源取自高雄醫學大學附設中和紀念醫院感染內科門診及病房疑似登革熱症狀病患之血清 5ml，收集後立即 4°C 送至實驗室，分離好的血清分小瓶裝冷凍於 -70°C，分成數個小瓶裝的血清直到實驗時才取出，再分別進行以下實驗。本實驗另有四型 prototype strain 包括第一型(Hawaii strain)，第二型(New Guinea)，第三型(H-87 strain)，第四型(H-241 strain)。本研究預計收集 92 年 1 月到 92 年 11 月來高醫就診懷疑是登革熱病人約 300 個進行一系列的實驗。

(二) C6/36 細胞與病毒接種繁殖:

C6/36 是蚊子細胞培養於含有 10% 胎牛血清及 2% Nonessential amino acid 之 EMEM 中。待細胞長滿即換成含 2% 胎牛血清之 maintain medium，即可加入臨床收集病人之血清。等培養 5 天後，再以無菌吸管括下細胞，製成螢光抹片，再分別以 4 型單株抗體(ATCC，HB-47，HB-46，HB-49 及 HB-48) 反應，接著在加入 FITC-conjugated goat antimouse IgG，反應完清洗 3 次，吹乾後置於螢光顯微鏡下觀察。

(三)病毒 RNA 之萃取:

取 serum 250 μ l 加入 750 μ l TRIzol 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘，加入 200 μ l chloroform 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘； 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置於一新的 1.5cc 離心管，再加入 500 μ l 之 Isopropanol，13000 rpm 離心 10 分鐘，丟棄上清液，再加入 1000 μ l 75% 酒精，13000 rpm 離心 15 分鐘，丟棄上清液，待風乾後，加入 50 μ l 滅菌水存於 -70°C 備用。

(四) Realtime RT-PCR (LightCycler RT-PCR)

primers :

	Tm(°C)
Primer(5' -ggATAgACCAgATCCTgCTgT)	65.4
Primer(5' -CATTCCATTTTCTggCgTTC)	64.7
probe(5' -6FAM-CAgCATCATTCcAggCACAg T XT p)	61.4

(五) 登革熱病毒株基因選殖:

1. RT-PCR

另選 E/NS1 junction 之一對 primers 進行 RT-PCR

(5' GACAACAATGATGGGAGCGAAGAGAATGGC3' AND

5' TCAACTCAGTGGGCTGAGGCCGCAGAGATC3' , 大小產物是 611bp

2. 產物 3' 端補平

10X buffer	5 ul
d NTP(0.5 mM)	5 ul
Klenow enzyme	1 ul
DNA	30 ul
H ₂ O	9 ul

37°C 作用 2 小時，P/C/I 純化，酒精沉澱

3. Insert 5' 端加磷酸根

DNA	20 ul
T4 kinase	1 ul
10X Buffer	5 ul
ATP(1mM)	4 ul
H ₂ O	20 ul

37°C 作用 2 小時 65°C 作用 5 分鐘，P/C/I 純化，酒精沉澱

4. Ligation

Vector	3 μ l
--------	-----------

Insert	1.5 μ l
DDW	3.5 μ l
Buffer	1 μ l
Ligase	1 μ l

14°C，感作 overnight

5. Transformation

- a. 將 Competent cell (*E. coli Top 10F'*) 由 -70°C 取出，放在冰上回溫約 10 分。
- b. 解凍取 50 μ l 至新的滅菌過 1.5 ml 的 eppendorf 要溫和的動作。
- c. 加入純化的質體 5 μ l，溫和的邊加邊用 tip 攪拌
- d. 靜置冰上 30 分鐘使其充份感作。
- e. 42°C 感作(heat shock) 2 分鐘
- f. 冰上 5 分鐘
- g. 加入 250 μ l LB，再溫和的移至 50 ml 離心管，37 度振盪培養一個小時
- h. Plate out 在含 ampicillin 之 LB plate。

6. Plate out 取 $150\ \mu\text{l}$ ，用 L 型玻璃棒，均勻塗於 plate 上
upside down 置於 37°C 培養箱中培養 18 小時左右
(不可超過 20 個小時，不然會有衛星菌)

7. 重組基因之確認(小量質體 DNA 抽取)

取得含重組基因之單一菌落，於 5 ml 的 LB 培養液，隔夜培養，
翌日於無菌操作取菌液 1 ml。

- a. 菌液 1 ml to 1.5ml 離心管以 10000 rmp 離心 10 分鐘抽去上清培養液體加上 $100\ \mu\text{l}$ solution I resuspend and vortex at room temperature for 5 min。
- b. 加上 $200\ \mu\text{l}$ solution II 溫和反轉數次(7~8 次)，室溫 5 分鐘。
- c. 加上 $150\ \mu\text{l}$ solution III，溫和反轉數次(7~8 次)，呈白色沉澱物 on ice for 5 min 以 13000 rmp 離心 15 分鐘。
- d. 收集上清液 (即 plasmid DNA)，置新試管加入等量的 P/C/I 混合至乳糜狀以 13000 rmp 離心，15 分鐘取上清液 $400\ \mu\text{l}$ 至新管子(*小心勿抽到下層的有機層)。
- e. 加入 3M sodium acetate $40\ \mu\text{l}$
加入 propanol $400\ \mu\text{l}$

放入冰箱 -70°C ，1hr，以 13000 rmp 離心 30 分鐘

(小心抽去上清液，保留白色 pellet)

- f. 加入 70% ethanol $1000\ \mu\text{l}$ (洗去鹽離子)，以 13000 rmp 離心 10 分鐘 小心抽去上清液後風乾加入 $15\ \mu\text{l}$ sterile DDW*(小心勿將 DNA 洗掉)

8. Check Insert

抽取菌中的質體，使用 *Eco*R I 及 *Hind* III 限制酶切割，並加入 RNase 加以消化 RNA。

DNA	$15\ \mu\text{l}$
<i>Eco</i> R I	$1\ \mu\text{l}$
<i>Hind</i> III	$1\ \mu\text{l}$
RNase	$1\ \mu\text{l}$
10X Buffer	$2\ \mu\text{l}$

37°C ，感作 3 小時

(六) 定序後之資料以 DNA star 軟體作基因序列及安機酸序列比對，並作親緣關係及演化速率之分析

三、結果

自 2001 年一月至 2002 年二月底止，在高醫附設醫院共有 577 位患者因臨床症狀疑似患有登革熱。其中經實驗室檢驗確認感染登革熱者有 405 人。其中 222 位 IgM 陽性，241 位 IgG 有四倍上升，151 位登革熱 PCR 呈陽性反應。經實驗室檢驗確認感染登革熱 405 人中有 311 位患者為典型登革熱患者，94 位為登革出血熱患者。405 人中有 9 人死亡，這九人都是登革出血熱患者。經實驗室檢驗確認感染登革熱的 405 人的臨床症狀統計如下：發燒(93.7%)、寒顫(42.1%)、皮疹(9.1%)、淤斑(ecchymosis)(0.8%)、出血症狀(13.5%)、嘔吐(12.4%)、噁心(0.3%)、腹瀉(5.2%)、腹脹(9.9%)、下腹痛(0.3%)、黑便(1.7%)、食慾不振(8.3%)、骨骼酸痛(59.0%)、頭痛(28.4%)、呼吸急促(12.4%)、咳嗽(1.4%)、焦慮(0.3%)。再就典型登革熱及登革出血熱兩組的臨床症狀表現做比較，則登革出血熱組比典型登革熱有較少比例有皮疹($p=0.01$)，登革出血熱組比典型登革熱有較多比例有嘔吐的現象($p=0.004$)。

典型登革熱和登革出血熱患者所需之住院天數有明顯的差異性($p=0.001$)，典型登革熱患者的平均住院天數為 5.29 天(SD 3.71 天)，登革出血熱患者的平均住院天數為 6.94 天(SD 4.87

天)。

對於有高血壓、糖尿病、風濕免疫疾病、癌症、慢性肺病、肝膽疾病、胃腸疾病、慢性腎病、洗腎患者、有手術史，使用免疫抑制劑，或類固醇或 NSAID(Non-steroid anti-inflammatory drug)使用者、以及以往曾得過登革熱等因素是否會影響病人是典型登革熱或是登革出血熱的分析顯示有糖尿病及慢性腎功能不全的人和曾得過登革熱者被登革熱病毒感染時較多會成為登革出血熱($p=0.037, 0.025, 0.003, \text{ respectively}$)，多變項分析顯示只有以往曾得過登革熱為唯一顯著因子($P=0.008$)。再就上述各病人固有疾病及病史諸因素與病人死亡之相關性做比較發現糖尿病、慢性腎功能不全、及年齡大於 65 歲在單變項分析為與死亡相關之危險因子，多變項分析顯示只有慢性腎功能不全為唯一顯著因子，其他因素與病人死亡無統計學上之相關性。

典型登革熱和登革出血熱患者自症狀出現到開始就醫的時間沒有明顯的差異性 ($\text{mean}\pm\text{SD}, 0.85\pm1.56 \text{ vs } 0.98\pm1.77, p=0.443$)，登革出血熱患者較典型登革熱自症狀出現到開始住院的時間則明顯的較短 ($\text{mean}\pm\text{SD}, 3.26\pm1.98 \text{ vs } 3.74\pm2.02, p=0.021$)。

病患的年齡、性別、職業、及教育程度不是影響病人自症狀出現到開始就醫的時間及自症狀出現到開始住院的時間的顯著因素。惟學生較工人及服務業工作者自症狀出現到開始住院的時間有顯著較短($p=0.032, 0.008,$ respectively)。就典型登革熱及登革出血熱兩組的年齡做比較，則登革出血熱組的病患年齡有較大的趨勢($p=0.079$)，但是死亡患者的年齡較存活者有顯著的較高(mean 63.8 vs 48.9, $p=0.006$)。病患的性別、職業、及教育程度不是影響病人發生典型登革熱或登革出血熱的顯著因素。

登革熱患者之腹部超音波：共有 276 個疑似登革熱病人有接受腹部超音波檢查，其中 188 位為登革熱檢驗陽性病人。在 188 位登革熱檢驗陽性且有接受腹部超音波檢查病人的檢查結果發現有 91 位(48.4%)患者有脂肪肝，25 位(13.3%)有慢性肝病病變(chronic liver disease)，5(2.7%)有肝硬化，3(1.6%)有肝囊腫(cyst)，3 位有膽囊息肉，13(6.9%)有膽結石，10(5.3%)有膽砂，五位有種膽管擴大，76(40.4%)有膽囊壁增厚之情形，52(27.7%)有腹水，39(20.7%)有肋膜積水，4 位(2.1%)有脾臟腫大。10(6.4%)有腎結石，8(4.3%)有慢性腎病之變化，8(4.3%)有腎囊腫，沒有患者有水腎(hydrophrosis)。再就典型登革熱及

登革出血熱兩組的腹部超音波表現做比較，則登革出血熱組比典型登革熱有較少比例有脂肪肝(25/71 vs 66/117, $p=0.004$)，登革出血熱組比典型登革熱有較多比例有腹水及(45/71 vs 7/117, $p<0.001$)，肋膜積水(34/71 vs 5/117, $p<0.001$)，膽囊壁增厚(37/71 vs 39/117, $p=0.014$)。

登革熱病毒量檢驗結果，在 2002 年 9 月 20 日至 2002 年 10 月 19 日共 30 日間因疑似登革熱至某醫學中心求診之所有患者共有 101 位個案，這。其中 88 位個案有連續檢體並血清學報告陽性，再去除檢體不完整或檢體收集或保存不良者，最後只有 77 例個案的不同時間之病毒檢體，共 211 個檢體在進行登革熱病毒量檢驗後進行分析。此 77 例個案有 72 位是典型登革熱，五位為登革出血熱。有 19 個住院 Day 1 檢體，73 個住院 Day 2 檢體，58 個住院 Day 3 檢體，42 個住院 Day 4 檢體，4 個住院 Day 5 檢體，3 個住院 Day 6 檢體，2 個住院 Day 7 檢體，6 個住院 Day 8 檢體，3 個住院 Day 9 檢體，1 個住院 Day 10 檢體。在住院 Day 1 之 19 個檢體只有 1 個檢體 PCR 陽性，住院 Day 2 之檢體則有 57.2% (41/73) 陽性，住院 Day 3 之檢體有 59.6% (34/58) 陽性，住院 Day 4 之檢體有 42.9% (18/42) 陽性。其餘住院日因檢體量少所以不做陽性比率之統計。因不同住院日之檢體來自不同患者，在

不同之疾病病程，或退燒或尚未退燒，所以此不同住院日之陽性比例只表示在實際臨床狀態下，病人住院後抽血做 PCR 檢驗陽性比率不高之狀況。登革熱 病患若發燒超過 7 天，在發病(以發燒日起始為第 0 天)第八天及第九天對病人進行定量 PCR 之檢測，在本研究各有 2 人(6 人受測)及 1 人(2 人受測)仍可檢驗出有病毒量。

由於是在固定研究期間沒有選擇性的收集連續性檢體，所以在 101 位患者中只有五位登革出血熱患者合乎後續分析之條件，其中一位因住院後很快於加護病房中死亡、只有一次之檢體。比較典型登革熱和登革出血熱患者在不同發病日(以發燒日起始為第 0 天)之病毒量之比較，則在發病之第四、五日(各有登革出血熱患者 4 個及 5 個檢體)和典型登革熱患者發病之第四、五日之病毒量(各有 37 個及 31 個檢體)相比較，以 t-test 做檢定無明顯差異。檢討此結果，因登革出血熱之個案數少，所以統計上不易分析出有顯著差異 (P=0.478, P=0.325, respectively)。

共有 120 位患者接受眼科之眼底鏡檢查，沒有任何患者有網膜出血或其他出血病變。

為了要瞭解 91 年這些分離株核甘酸變異情形，本研究利用基因選殖技術分析 envelope/nonstructural protein 1 (E/NS1) gene junction 之一段 240 bp 序列，再與歷年來台灣本土第二型株及外國株做比較。結果發現，91 年株之間差異只有 0.4%到 1.3% ，若與台灣歷年株比較差異為 4.4%到 6.6%，與外國株之差異為 4.4%到 7.6%。(表二) 由 DNASTAR 軟體所作成的 Phylogenetic tree，可將這些分離株分成二個基因群。(圖一) 台灣歷年分離株與外國株皆屬同一基因群，而 91 年分離株明顯的獨立於一基因群。這些分離株之核甘酸變異多發生在 codon 之第三位置，因此大多屬於 silent mutation。而氨基酸序列分析，7601 及 7602 株(民國 76 年分離)於第 772 個氨基酸由 Methionine 轉變為 Valine，91 年分離株皆在第 742 個氨基酸由 Isoleucine 轉變為 Valine。(圖二)

四、討論

由 CDC 資料顯示 2002 年登革熱感染者有 93.6% 為成年人，和許多地區以兒童和青少年為主不同[Gubler DJ, 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-96.]。

文獻上有關病人固有疾病(underlying disease)和登革出血熱之相關性研究顯示在 1981 年古巴地區支氣管性氣喘(bronchial asthma)，糖尿病及鎌性血球貧血(sickle cell anaemia)為登革出血熱之危險因子[Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP, 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 816-20.]。在 1997 年巴西地區研究顯示高血壓、支氣管性氣喘(bronchial asthma)和糖尿病為登革出血熱之危險因子[Cunha RV, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Barbosa AM, Paiva FG, Miranda RM, Ramos CC, Coelho JC, dos Santos FB, Nogueira RM, 1990. Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, in 1997. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 247-9.]。本次研究發現糖尿病、慢性腎功能不全、及以往曾得過登革熱為得到登革出血熱之顯著因子($p=0.037$, 0.025 , 0.003 , respectively)。多變項分析顯示只有以往曾得過登革熱為唯一顯著因子($P=0.008$)。有

九位死亡病例。糖尿病、慢性腎功能不全、及年齡大於 65 歲在單變項分析為與死亡相關之危險因子，多變項分析顯示只有慢性腎功能不全為唯一顯著因子。臨床上應特別注意慢性腎功能不全之患者之登革熱感染。

有些患者發燒大於七日，以定量 PCR 仍可檢測到病毒。因此為使登革熱之實驗室診斷機會增加，若登革熱病人發病超過七日仍有發燒，應仍可以採集檢體送驗。

由 Phylogenetic tree 分析，可知 91 年分離株是獨立屬於一基因群。而台灣歷年分離株與外國株較相近，是屬於同一基因群。而此分析可知 91 年於南台灣造成的第二型登革熱為本土株引起的流行而非境外移入株所引起的流行。由於近十年來台灣並沒有第二型本土株被分離，因此這些基因變異是否由於原本就存在台灣的第二型登革熱病毒經十年來所演化的結果，這應與近兩三年來外國的第二型流行株進一步作比較才可確定。此部份是本計劃欲繼續完成的。

五、參考文獻

- 1、 Gubler DJ. :Dengue and dengue hemorrhagic fever : its history and resurgence as a global public health problem , p.1-22.In D.J.Gulber and G.Kuno(ed.)Dengue and dengue hemorrhagic fever . CAB International , New York , N.Y. J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
- 2、 Rice CM , Lences EM , Eddy SR , Shin SJ , Sheets RL , and Strauss JH . : Nucleotide sequence of yellow fever virus : implications for flavivirus gene expression and evolution . Science 229 p726-733 ,1985 .
- 3、 Hemchal EA, and Putnak JR : The dengue virus. Clin. Microbiol. Rev. 3 p376-396, 1990.
- 4、 Wu YC :Epidemic dengue 2 in LiouChyou Shiang , Pingtung County , in 1981 . Chin . J . Microbiol . Immunol . 19:203-211. J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
- 5、 Wu YC :epidemic and control of Japanese encephalitis and dengue fever in Taiwan . WHO Dengue Bull . 20:51-54. J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
- 6、 Hsieh WC, Chen MF , Lin KT , Hsu ST , Ma CI , and Wu SS : Outbreak of Dengue fever in 1981 in Liouchyou Shiang , Pingtung County . Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi 81 :1388-1395 . J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
- 7、 Harn MR , Chiang YL , Tian MJ , Chang YH , and Ko YC : The 1991 dengue epidemic in Kaohsiung City . J . Formos . Med .Assoc.92(suppl.1):S39-S43 . J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40

- p1840-1844, 2002
- 8、 Ko YC , Chen MJ , and Yeh SM :The predisposing and protective factors against dengue virus transmission by mosquito vector . Am . J . Epidemiol . 136:214-220. J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
 - 9、 Halstead SB , Rojanasuphot S , and Sangkawibha N :Original antigenic sin in dengue . Am . J. Trop . Med . Hyg.32:154-156 . J.CLIN.MICROBIOL. Vol:40 p1840-1844, 2002
 - 10、 Russill PK , and Nisalak A : Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test . J . Immunol . 99 p291-296 , 1967
 - 11、 Clarke DH , and Casals J : Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropodborne virus . Am . J. Trop . Med. Hyg . 7 p561-573,1958
 - 12、 Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21 p224-226 , 2002
 - 13、 Acta Virol 45(5-6) p299-304 , 2001
 - 14、 Indian J Med Res ;115:p31-36 , 2002
 - 15、 Marita k , tanaka M , Igarashi A:Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction . J Clin Microbiol 29 : p2107-2110 1991
 - 16、 J Virol Methods ;102(1-2):p113-117 , 2002
 - 17、 J Virol Methods ;98(2) : p119-125 , 2001
 - 18、 J Microbiol Immunol Infect ; 33(4) : p217-222 , 2000
 - 19、 FEMS Immunol Med Microbiol ;3091- : p1-7 , 2001
 - 20、 J Virol Methods ;95(1-2) : p 19-32 ,2001
 - 21、 J Med Virol ; 63(1) : p29-34 , 2001

- 22、 Journal of clinical microbiology : p2323-2330 , 2002
- 23、 Journal of clinical microbiology : p2794-2798 ,2001
- 24、 Journal of clinical microbiology : p4119-4124 , 2001
- 25 、 Haritoglou C, Scholz F, Bialasiewicz A and Klauss V : Ocular manifestation in dengue fever. Ophthalmologie June, 97 (6) :433-6, 2000.
- 26 、 Wen KH, Sheu MM, Chung CB, Wang HZ and Chen CW : The ocular fundus findings in dengue fever. Kaohsiung J Med Sci 5 (1) :24-30, 1989.

六、圖表

Table 1. Univariate analysis of underlying disease and past history as the risk factor for dengue hemorrhagic fever.

Variable	No. evaluated	No. of variable/No. of DF	No. of variable/No. of DHF	OR(95% CI)	P value
male	405	158/311	44/94	1.17(0.74-1.86)	0.497
Pulmonary disease	389	12/298	4/91	1.10(0.35-3.48)	1.0
Gardiac disease	373	19/286	8/87	1.42(0.60-3.37)	0.421
Chronic liver disease	359	41/279	12/80	1.02(0.51-2.06)	1.0
Chronic renal insufficiency	388	6/297	7/91	4.04(1.32-12.35)	0.016
Diabetes mellitus	405	28/311	16/94	2.07(1.07-4.03)	0.029
hypertension	405	69/311	25/94	1.27(0.75-2.16)	0.404
malignancy	405	12/311	5/94	1.40(0.40-4.08)	0.559
Gout	405	10/311	4/94	0.75(0.23-2.44)	0.747
Past history					
dengue	405	50/311	29/94	2.33(1.37-3.97)	0.002
operation	399	4/307	2/92	1.68(0.30-9.34)	0.625
Recent medication					
steroid	405	3/311	0/94	0.99(0.98-1.00)	1.0
NSAID	405	7/311	2/94	0.94(0.19-4.62)	1.0
Age					
>65	405	50/311	19/94	0.76(0.42-1.36)	0.350

Rheumatic diseases included 2 SLE and 1 RA cases. NSAID: non-steroid anti-inflammatory drugs.

Table 2. Divergence of nucleotide sequence among these strains.

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	█	99.6	97.1	97.5	97.5	96.7	94.2	94.6	95.0	96.2	96.7	96.7	96.2	97.1	97.5	98.3	1	7601
	2	0.4	█	97.5	97.9	97.9	97.1	94.6	95.0	95.4	96.7	97.1	97.1	96.7	97.5	97.9	98.8	2	7602
	3	3.0	2.6	█	99.6	99.6	99.6	93.8	94.2	94.6	99.2	97.1	97.1	96.7	99.2	98.8	98.8	3	7701
	4	2.6	2.1	0.4	█	99.2	99.2	94.2	94.6	95.0	98.8	97.5	97.5	97.1	98.8	99.2	99.2	4	7702
	5	2.6	2.1	0.4	0.8	█	99.2	94.2	94.6	95.0	98.8	97.5	97.5	97.1	99.6	99.2	99.2	5	8301
	6	3.4	3.0	0.4	0.8	0.8	█	93.3	93.8	94.2	98.8	96.7	96.7	96.2	98.8	98.3	98.3	6	8302
	7	5.7	5.3	6.2	5.7	5.7	6.6	█	99.6	99.2	92.9	93.3	93.3	92.1	94.6	94.2	94.2	7	9101
	8	5.3	4.8	5.7	5.3	5.3	6.2	0.4	█	98.8	93.3	93.8	93.8	92.5	95.0	94.6	94.6	8	9102
	9	4.8	4.4	5.3	4.8	4.8	5.7	0.8	1.3	█	93.8	94.2	94.2	92.9	95.4	95.0	95.0	9	9103
	10	3.9	3.4	0.8	1.3	1.3	1.3	7.1	6.6	6.2	█	96.2	96.2	95.8	98.3	97.9	97.9	10	New Guinea-44
	11	3.0	2.6	2.6	2.1	2.1	3.0	6.2	5.7	5.3	3.4	█	100.0	98.8	97.1	98.8	97.5	11	K0049-THAI95
	12	3.0	2.6	2.6	2.1	2.1	3.0	6.2	5.7	5.3	3.4	0.0	█	98.8	97.1	98.8	97.5	12	C0452-THAI95
	13	3.4	3.0	3.0	2.6	2.6	3.4	7.6	7.2	6.7	3.9	1.3	1.3	█	96.7	98.3	97.9	13	8697-VENE95
	14	3.0	2.6	0.8	1.3	0.4	1.3	5.3	4.8	4.4	1.7	2.6	2.6	3.0	█	98.8	98.8	14	49-CUB81
	15	2.6	2.1	1.3	0.8	0.8	1.7	5.7	5.3	4.8	2.1	1.3	1.3	1.7	1.3	█	99.2	15	382-MEXI95
	16	1.7	1.3	1.3	0.8	0.8	1.7	5.7	5.3	4.8	2.1	2.1	2.1	1.7	1.3	0.8	█	16	1452-VENE94
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			

Fig 1. Dendrogram based on nucleotide sequence divergence (%) among these trains.

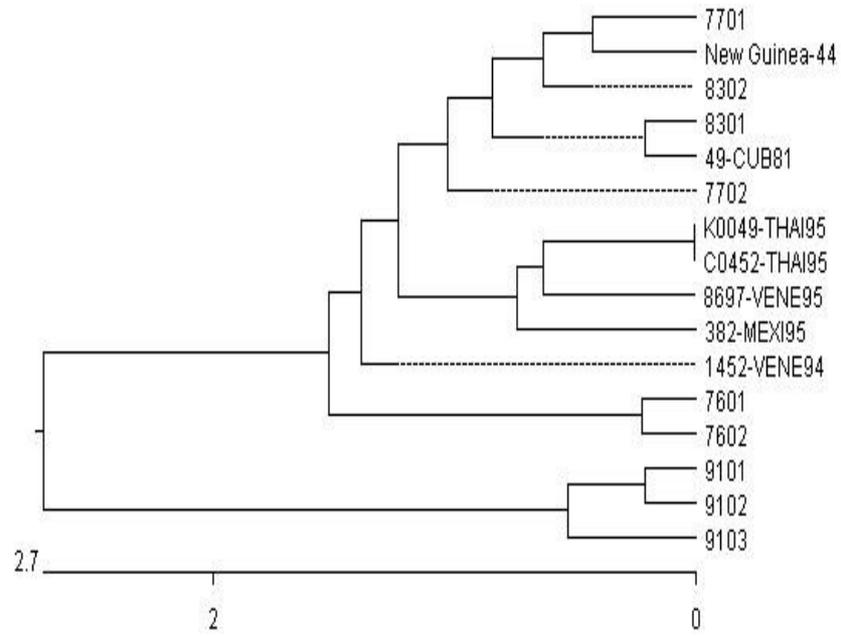


Fig 2. Alignment of deduced amino acid sequences at the E/NS1 gene junction.

