計畫編號：DOH 101-DC-2305

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

台灣地區日本腦炎病毒之監測與特性之分析

研究報告

執行機構： 疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人： 舒佩芸

協同主持人： 鄧華真

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

執行期間：101 年 1 月 1 日至 101 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		
中文摘要		(3)
英文摘要		(4)
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	(23-24)
表次		(25-29)
圖次		(30-34)

共 (34)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，主要分佈於亞洲，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 10-37 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，顯示台灣的環境因素、病媒蚊生態及具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，但近年來第一基因型（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 2012 年大部分病媒蚊感染之日本腦炎病毒皆屬於 Genotype I （台北市、宜蘭縣、花蓮縣、台中市、台南市），僅少數在台北市採集到的病毒屬於 Genotype III。這與台灣地區在 2008 年以前的病毒皆屬於 Genotype III 的明顯不同，也與 2008-2009 年只能在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已由 Genotype III 轉移至 Genotype I。目前 Genotype I 已成為台灣最主要的日本腦炎病毒基因型別。初步中和抗體試驗（PRNT）結果顯示日本腦炎病人血清中，對 Genotype I 與 Genotype III 病毒之中和抗體有很高的交叉反應(cross-reaction)。但一般人對 Genotype I 的中和抗體效價普遍偏低，顯示現有的 Nakayama 疫苗對目前台灣流行的 Genotype I 日本腦炎病毒株所提供的保護力較弱，可能會增加受 Genotype I 日本腦炎病毒感染的風險。

關鍵詞：病媒性傳染病、日本腦炎病毒、基因型 I、基因型 III

英文摘要

Japanese encephalitis (JE) is wide spread in Asia and is endimic 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 Japan, Vietnam, South Korea, Thailand and China, and cocirculated with or replaced the GIII strains. Our surveillance data in 2012 showed that most of the JEV strains isolated in Taiwan belonged to GI (Taipei City, Yilan County, Hualien County, Taichung City, Tainan City), and only a few JEV strains isolated from Taipei City belonged to the GIII. 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. Our preliminary PRNT results showed that JE patients' sera contain high cross-reactive neutralizing antibodies against both GI and GIII JEV strains. However, neutralizing antibody titers against GI were relatively weak in healthy donors. The results suggested that the current Nakayama vaccine may have low seroprotection rate against GI of JEV. **Keyword**：vector-borne infectious disease、Japanese encephalitis virus、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、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。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（1）。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（2）。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。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（3）。

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（3-5）。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 10 至 37 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（6）。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 1968 年起，政府對兒童全面施行二劑日本腦炎疫苗注射，1974 年起增加一劑，1983 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(共 4 劑)。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（3,7）。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.金等人曾於 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（8）。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. Liau 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（9）。研究結果顯示，以年齡層區分來看，日本腦炎中和抗體陽性率是呈”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減。

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（10-14），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（15）。 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日本、越南、韓國、泰國、和中國（14,16-19）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（15）。

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；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（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）（22）。2009 年，又在台北市關渡自然公園(共 6 株)及台中縣霧峰鄉(共 2 株) 分離到 Genotype I 病毒；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 Genotype III 成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型(22,23)。

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），與台灣現在流行的 Genotype III 本土病毒株（cluster 1 及 2）在 E 基因序列上有一些差距。又 Genotype I 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，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。本計畫持續實施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 2012 年台灣各地區具有代表性的本土流行日本腦炎病毒株，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，觀察是否與疫苗株之間的變異有加大的趨勢，藉以評估日本腦炎疫苗的有效性，並提供未來疫苗改進、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：

   (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℃下，以 10%糖水餵食 5 天後，依種類、性別、地點、日期，每 50 隻集合成 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 500μL 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。

2. **血清檢體及病毒株來源**：血清檢體來源為通報自疾管局之各種病媒病毒傳染病。病毒來源為疾管局歷年自行分離或購自 ATCC 之各種病媒病毒株。

3. **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，可以選擇性的與核醣核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。每一蚊子 pool 取 140μL 上清液，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 μl 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。

4. **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’-TGTCAATGCTTCCCTTCCC-3’.

5. **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（24）：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μl 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μl QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μl 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μl。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。

6. **日本腦炎病毒的分離與鑑定：**Real-time RT-PCR 陽性檢體進行病毒分離與基因定序。病毒的分離與鑑定，是將病媒蚊均質液以 C6/36 細胞株培養約 3-7 天後分離出病毒，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 鑑定分離之病毒及其血清型（25）。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。

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，**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。

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（26）。簡單來說，在 24 孔培養板準備單層 BHK - 21 細胞，維持在 37℃的二氧化碳培養箱。測試血清先於 56℃ 水浴 30 分鐘做去活化處理。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(130μl)去活化血清檢體均勻混合，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 37℃，5％二氧化碳培養箱培養 60 分鐘，使病毒吸附，再以 PBS 洗去未吸附之病毒，然後每孔添加含 1％甲基纖維素培養基之細胞培養液，於 35℃，5％二氧化碳培養箱培養 3～5 天。最後以 0.9％ NaCl 溶洗掉甲基纖維素培養基，再以 Naphthol blue- black solution 染色，計算溶斑數。中和效價的定義是降低 50％溶斑數之最高血清稀釋倍數。

9. **間接酵素免疫分析法（ELISA）**:將純化出之抗 Flavivirus envelope protein 之單株抗體(D0003)用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microwell immunoassay strips，4℃隔夜後，以 1% BSA 進行 Block，於 37℃反應一小時，清洗 4 次後，加等量病毒：DENV mixture1-4、Nakayama strain、JEV/TC1006a、JEV/TN1205b、JEV/TN1205a 及 spent medium contral(作為 negative control; NC)，置於 37℃保溫箱中震盪半小時。清洗 4 次後，以 PBST

（PBS-0.5%Tween20-1%BSA-2.5%NRS）稀釋待測血清檢體（1:100 dilution）及陽性、陰性控制組檢體，置於 37℃保溫箱中震盪半小時。清洗 4 次，加入山羊抗人 IgG-alkaline phosphatase 二次抗體 (Goat anti-human IgG AP) 於 37℃保溫箱中震盪半小時，清洗 4 次，每孔中加入 100ul pNPP 呈色劑，置於室溫及暗處呈色反應約 30-60 分鐘，最後以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。

結果

1. **2012 年日本腦炎病媒蚊採集、RT-PCR 篩選及病毒分離：**我們在 5/15-7/10 間每周調查及採集 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台北市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。圖一為 2012 年病媒蚊採集之結果，包括 RT-PCR 陽性蚊子池數(No. mosquito pool)及病毒分離陽性結果。我們分別在花蓮縣壽豐鄉養豬戶、台南下營養豬戶、台中霧峰養豬戶、宜蘭縣五結鄉養豬戶及台北市北投區關渡自然公園/濕地分離出日本腦炎病毒，並進行基因定序工作。

2. **日本腦炎病毒 Envelope protein (E) 基因的親緣性分析：**為了瞭解本土日本腦炎病毒株的基因特性，我們將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。圖二為日本腦炎病毒基因型 I (Genotype I; GI) 病毒株之分析結果。台灣從 2008 年開始發現 GI 以來至 2012 年間所分離到的 GI 日本腦炎病毒株可將其分為三個族群（Cluster 1-3）。Cluster 1 包含最多的病毒，2009 年最早在北部及中部發現，2010-2011 除北部及中部外，東部也開始分離出病毒，2012 此一族群的病毒分布於所有北、中、南、東的採集點。GI Cluster 1 的病毒與日本的 09P141 病毒株在親緣上最為接近。此外在今年我們也首次從一位居住於台南市的病人血清中分離出屬於此一族群的病毒(H1010739 strain)。在 GI Cluster 2 部分，目前在台灣只發現一株病毒，出現於 2008 年台北市關渡地區，其後並未再發現此一族群的病毒。GI Cluster 2 的病毒與中國南方的病毒株在親緣上最為接近。GI Cluster 3 包含一株 2008 年在宜蘭發現的病毒株，二株 2010 年在台中市發現的病毒株及 2012 年在台南出現的一株病毒株，此一族群的病毒也與中國的病毒株在親緣上最為接近。由序

列分析結果顯示，台灣 GI 病毒株間之 E gene 核酸序列變異度約為 3%，約有 50 個核苷酸之差異，由此判斷，台灣的 GI 病毒株應是多次由境外引進不同病毒株的結果。若是從北方引進，則中國與日本是最可能的來源。**圖三**為日本腦炎病毒基因型 III (Genotype III; GIII) 病毒株之分析結果。台灣在 2008 年以前所分離到的日本腦炎病毒株皆屬於 GIII，GIII 病毒株亦可將之分為三個族群(Cluster 1-3)。GIII Cluster 1 包含最多近年來（2005-2010 年）分離到的台灣 GIII 病毒，但至 2009-2010 年，此一族群的病毒只在台灣東部及中部發現，2011 年後就未在台灣發現這一族群的病毒。此一族群的病毒與菲律賓的病毒株在親緣上最為接近，是否已在台灣消失？則仍有待持續的病毒監測。GIII Cluster 2 雖包含近年來較少的台灣病毒株，但由 2012 年的監測結果顯示，此一族群的病毒是台灣目前僅存的 GIII 病毒族群，僅在台北市關渡自然公園/濕地被發現。GIII Cluster 3 則自從 2005 年開始監測日本腦炎病媒蚊以來，從未被發現過，顯示此一族群的病毒應已在台灣消失。**表二**綜合 2005-2012 年日本腦炎病毒基因型在台灣的分布，顯示台灣的日本腦炎病毒的主要基因型別已由 GIII 變成 GI。

3. **日本腦炎病毒疫苗株與本土病毒株之序列比對：**表三為疫苗株與本土病毒株之 E gene 序列比對結果。在核酸序列比對方面，Nakayama 疫苗株屬於 GIII Cluster 3，與本土 GIII Cluster 1 病毒株的變異性約為 6%，與本土 GIII Cluster 2 病毒株的變異性約為 3%。Nakayama 疫苗株與本土 GI Cluster 1 及 Cluster 3 病毒株的變異性可達 12-14%，可見 Nakayama 疫苗株與本土 GI 病毒株在核酸序列上有很明顯的差異性。但若比較氨基酸序列，則 Nakayama 疫苗株，與本土 GI 病毒株的變異性只有約 2%，差異性不大。**表四**為疫苗株與本土病毒株之 E protein 氨基酸序列的比對結果，Nakayama 疫苗株與本土 GIII Cluster

1 及 Cluster 2 病毒代表株的差異分別為 6 及 4 個氨基酸，與本土 GI Cluster 3 及 Cluster 1 病毒代表株的差異為 9 個氨基酸，變異性並不大，但位於 E protein domain I-domain II hinge 及 Domain III ridge 區域之氨基酸可能與中和抗體的決定位(neutralizing epitope)有關。

4. **日本腦炎病毒中和抗體效價測定：**中和抗體效價測定採用 50%溶斑減少試驗法（PRNT）。檢體來自日本腦炎病人成對血清及主動監測之本國國人血清檢體。PRNT titer 是指達到某一個稀釋倍數時，與未加血清之溶斑數目比較，實驗組出現 50%溶斑減少，此一稀釋倍數即為該檢測血清的 PRNT titer。**表五及圖四**為 50%溶斑減少試驗法（PRNT）之代表性實驗結果，使用日本腦炎確定病例急性期及恢復期血清及主動監測之本國國人血清檢體，以 1:10 開始做 2 倍系列稀釋至 10,240 倍後進行 PRNT。為了解這些人對 Genotype I 及 Genotype III 本土病毒之 PRNT 抗體效價 cross-reaction 情形，我們挑選 Nakayama 疫苗株(GIII Cluster 3)、TC1006a（GIII Cluster 1）、TN1205a（GI Cluster 3）及 TN1205b（GI Cluster 1）本土株進行初步實驗。結果顯示日本腦炎確定病例恢復期血清對所有 4 株病毒都有很高的 PRNT titers，對 Nakayama 疫苗株有最高之中和抗體，對其他 3 株 GI 及 GIII 本土株 PRNT 抗體效價則均相同。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，但合理懷疑認為此 3 位病人因居住於中南部（2012 年感染）很可能是感染 Genotype I 病毒。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。在主動監測之本國國人血清檢體之中和抗體效價普遍偏低。若以年齡區分，5 與 10 歲年齡有較高的中和抗體效價，且以對 Nakayama 疫苗株有最高之中和抗體效價，對其他 3 株 GI 及 GIII 本土株 PRNT 抗體效價則較低且沒有明顯的差別。20 至 40 歲年齡的 6 個

人中，只有 2 位有中和抗體，也以對 Nakayama 疫苗株有較高的中和抗體效價，但其效價均很低。

5. **PRNT 與間接酵素免疫分析法（indirect ELISA）結果之比較：**PRNT 方法需耗費較多的人力及時間，間接酵素免疫分析法的優點為可利用自動化儀器進行，可同時節省人力及時間。**表六**為 ELISA 結果，P/N ratio 結果於**圖五及圖六。**比較 3 位日本腦炎確定病例檢體及主動監測之本國國人血清檢體之 PRNT titer 及 ELISA P/N ratio。若以 ELISA P/N ratio 大於 2 代表陽性，則 indirect ELISA 具有 100%的靈敏度。因 ELISA 除了可偵測中和抗體外，非中和抗體，或與其他黃病毒有交叉反應之抗體（cross reactive antibodies）也能測得到。結果顯示大於 20 歲之主動監測之本國國人血清檢體中的抗日本腦炎中和抗體效價普遍偏低，故 ELISA 應可應用於檢體初步篩選，區分陰性與陽性檢體後，陽性檢體再進行 PRNT 或 micro-PRNT 測其中和抗體。

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 ， 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，南部的病毒則大部分屬於 cluster 2。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 2005-2010 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（22），但 GIII Cluster 1 的病毒在 2011-2012 年間即未發現，可見這族群的病毒在台灣已逐漸減少，甚至消失。至今年（2012 年）只在北部地區發現少數幾株 GIII cluster 2 的病毒，表示台灣地區日本腦炎病毒隨著年代而改變，GIII 病毒已逐漸消失，被 GI 病毒所取代。

在 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。今年（2012 年）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、宜蘭縣、花蓮縣、台中市、台南市），只有在北部地區發現少數幾株 GIII 的病毒，顯示台灣地區日本腦炎病毒已快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype Ⅰ，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，Cluster 3），JEV/TC1006a（GIII Cluster 1）、JEV/TN1205a（GI Cluster 3）及 JEV/TN1205b（GI Cluster 1）本土株進行初步實驗。結果顯示日本腦炎確定病例恢復期血清對所有 4 株病毒都有很高的 PRNT titers，對 Nakayama 疫苗株有最高之中和抗體，對其他 3 株 GI 及 GIII 本土株 PRNT 抗體效價則較低且差異不大，顯示日本腦炎病人血清中，對 GI 與 GIII 病毒之中和抗體有相當高的 cross-reaction。在主動監測之本國國人血清檢體，中和抗體效價則普遍偏低，只對 Nakayama 疫苗株有較高之中和抗體效價，對其他 3 株 GI 及 GIII 本土株之中和抗體效價均偏低。現有的 Nakayama 疫苗產生中和抗體的效價也隨年齡的增加而降低，對高年齡的民眾是否能提供足夠的保護力，仍有待進一步的研究。

PRNT 方法需耗費較多的人力及時間，間接酵素免疫分析法的優點為靈敏度高，可利用自動化儀器進行，同時節省人力及時間。未來將可配合 PRNT 的方法，進行中和抗體之測定。

結論與建議

日本腦炎是台灣最重要的本土性病媒病毒傳染病，由於接種疫苗是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三十七例間，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，成人疫苗接種成為討論的議題。

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 年開始在台北市關渡自然公園、宜蘭縣五結鄉養豬場之蚊子分離到 Genotype I 病毒。2012 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、宜蘭縣、花蓮縣、台中市、台南市），只有在北部地區發現少數幾株 GIII 的病毒，顯示台灣地區日本腦炎病毒已快速的由 Genotype III 轉移至 Genotype Ⅰ，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。未來仍應加強監測，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。我們挑選挑選 Nakayama 疫苗株及 GI 及 GIII 本土病毒株進行初步實驗，結果顯示一般國人對本土病毒株之中和抗體效價普遍偏低。現有的

Nakayama 疫苗產生中和抗體的效價隨年齡的增加而降低，對高年齡的民眾是否能提供足夠的保護力，仍有待進一步的研究。

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 2012 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、宜蘭縣、花蓮縣、台中市、台南市），僅在台北市發現 Genotype III 日本腦炎病毒。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。綜合結果顯示，台灣地區日本腦炎病毒已快速的由 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，一般國人對本土病毒株之中和抗體效價普遍偏低。現有的 Nakayama 疫苗產生中和抗體的效價隨年齡的增加而降低，對高年齡的民眾是否能提供足夠的保護力，仍有待進一步的研究。

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，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. Vaughn DW, Hoke CH Jr. 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. Epidemiol Rev. 14:197-221.
2. Hu SMK, Grayston JT. 1962. Encephalitis on Taiwan II. Mosquito Collection and Bionomic Studies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 11：131-140.
3. 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.
4. Hsieh WC, Wang SP, Rasmussen AF. 1961. Epidemiology of Japanese encephalitis (JE) on Taiwan in 1960. J Formos Med Assoc 60, 825-830.
5. Grayston, JT, Wang SP, Yen CH. 1962. Encephalitis on Taiwan. I. Introduction and epidemiology. Am J Trop Med Hyg 11, 126-130.
6. Hsu TC, Chow LP , Wei HY, Chen CL, Hsu ST, Kitaoka M, Sunaga H. 1971. A controlled field trial for an evaluation of effectiveness of mouse-brain Japanese encephalitis vaccine. J. Formosan Med. Assoc., 70(2):55～62.
7. Ku CC, King CC, Lin CY, Hsu HC, Chen LY, Yueh YY, Chang GJ. 1994. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. J Med Virol 44, 122-131.
8. 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。
9. 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。
10. Hasegawa H, Yoshida M, Shiosaka T, Fujita S, 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.
11. 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.
12. 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.
13. Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardosa MJ, Barrett AD. 2003. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. J Virol. 77:3091–8.
14. 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.
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. 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.
17. 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.
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, Huoung 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. 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. 2010. Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus, Taiwan. Emerg Infect Dis. 16:876-8.
23. Chen YY, Fan YC, Tu WC, Chang RY, Shih CC, Lu IH, Chien MS, Lee WC, Chen TH, Chang GJ, Chiou SS. 2011. Japanese Encephalitis Virus Genotype Replacement, Taiwan, 2009–2010. Emerg Infect Dis. 17:2354-6.
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 PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. 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. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. J. Immunol. 99:285-290.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.

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 geographic distribution of JEV genotypes in Taiwan, 2005-2012.

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

Table3. Sequence variation at the nucleotide and amino acid levels of E gene among JEV strains.

JEV E gene seq (nucleotide)

JEV strain	Nakayama	Beijing-1	SA14-14-2	TC1006a(GIII-c1)	TPC1206c(GIII-c2)	TN1205a(GI-c3)	TN1205b(GI-c1)
Nakayama (GIII)		*0.030	0.034	0.057	0.027	0.123	0.126
Beijing-1 (GIII)	**34		0.031	0.055	0.026	0.119	0.123
SA14-14-2 (GIII)	51	47		0.049	0.016	0.121	0.126
TC1006a(GIII)	86	82	73		0.046	0.125	0.124
TPC1206c(GIII)	41	39	24	69		0.115	0.117
TN1205a(GI)	184	179	182	188	172		0.029
TN1205b(GI)	189	184	189	186	175	44	

JEV E gene seq (amino acid)

JEV strain	Nakayama	Beijing-1	SA14-14-2	TC1006a(GIII-c1)	TPC1206c(GIII-c2)	TN1205a(GI-c3)	TN1205b(GI-c1)
Nakayama (GIII)		0.012	0.012	0.012	0.008	0.018	0.018
Beijing-1 (GIII)	6		0.012	0.012	0.008	0.018	0.018
SA14-14-2 (GIII)	13	13		0.022	0.018	0.028	0.028
TC1006a(GIII)	6	6	11		0.004	0.014	0.014
TPC1206c(GIII)	4	4	9	2		0.010	0.010
TN1205a(GI)	9	9	14	7	5		0.004
TN1205b(GI)	9	9	14	7	5	2	

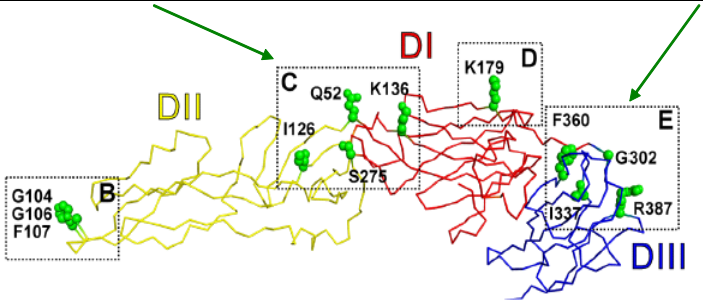
*p-distance (upper right)

**no. differences (lower left)

Table 4. Amino acid differences in E protein between vaccine and local JEV strains

Amino acid differences in E protein between vaccine and local JEV strains

E AA position	51	107	123	126	129	132	138	160	176	177	222	227	244	264	279	315	327	366	394	397	439	473	489	492
E Domain	I			II			I						II				III					TM		
Nakayama (GIII-c3)	V	L	S	T	T	P	E	G	I	T	A	P	E	Q	K	A	S	A	Q	H	K	V	R	V
Beijing-1 (GIII-c3)	S					S													H	Y		I	G	
SA14 (GIII-c2)	S											S							H				G	
SA14-14-2	S	F					K		V	A		S	G	H	M	V			H		R		G	
TC1006a(GIII-c1)	S			V								S							H				G	M
TPC1206c(GIII-c2)	S											S							H				G	
TN1205a(GI-c3)	S				M			E			S	S					T	S	H				G	
TN1205b(GI-c1)	S		N		M						S	S					T	S	H				G	



B: Fusion loop

C: DI-DII hinge

D: DI lateral ridge

E: DIII lateral ridge

Neutralizing epitopes of JEV E protein

Luca et al. J Virol 2012;86:2337

Table 5. Results of PRNT in JE patients and normal persons.

PRNT

	年齢	Nakayama (	TC1006a (	TN1205b	TN1205a
		GIII c3	GIII c1	GI c1	GI c3
Pt1-A3	31	20	1	1	1
Pt1-B21		10240	2560	2560	2560
Pt2-A4	32	20	1	10	1
Pt2-B15		5120	1280	1280	1280
Pt3-A6	41	160	40	10	80
Pt3-B15		10240	2560	2560	2560
S1	0	0	0	0	0
S2	5	40	10	20	10
S3	5	320	20	40	40
S4	5	40	0	0	10
S5	10	160	40	40	40
S6	10	80	80	40	80
S7	10	10	10	0	0
S8	20	0	0	0	0
S9	20	0	0	0	0
S10	30	20	10	10	10
S11	30	10	0	0	0
S12	40	0	0	0	0
S13	40	0	0	0	0
S14	50	10	0	0	10
S15	50	40	20	10	20
S16	60	160	80	80	160

Table 6. The results of E/M-specific indirect IgG ELISA in JE patients and normal persons.

E/M-specific indirect IgG ELISA

	DENV	Nakayama (	TC1006a (	TN1205b	TN1205a	NC
		GIII c3	GIII c1	GI c1	GI c3	
Pt1-A3	0.135	0.473	0.225	0.298	0.267	0.115
Pt1-B21	0.838	2.516	0.916	1.14	0.912	0.114
Pt2-A4	0.218	0.759	0.304	0.359	0.311	0.127
Pt2-B15	0.971	2.769	1.023	1.362	1.229	0.138
Pt3-A6	0.127	1.065	0.388	0.437	0.399	0.138
Pt3-B15	0.58	2.619	0.726	1.047	0.846	0.161
S1	0.173	0.326	0.242	0.252	0.206	0.208
S2	0.15	1.052	0.307	0.397	0.325	0.134
S3	0.145	2.361	0.389	0.772	0.655	0.11
S4	0.291	0.94	0.347	0.386	0.342	0.25
S5	0.21	1.238	0.447	0.602	0.545	0.202
S6	0.653	2.784	0.997	1.464	1.325	0.431
S7	0.326	1.248	0.611	0.755	0.695	0.29
S8	0.091	0.223	0.087	0.097	0.105	0.143
S9	0.14	0.14	0.122	0.115	0.102	0.165
S10	0.162	0.792	0.287	0.295	0.268	0.103
S11	0.11	0.245	0.147	0.14	0.114	0.118
S12	0.315	0.24	0.243	0.231	0.315	0.28
S13	0.252	0.444	0.323	0.291	0.318	0.283
S14	0.291	0.783	0.434	0.507	0.487	0.31
S15	0.254	0.873	0.361	0.449	0.449	0.144
S16	0.302	2.138	0.882	1.084	0.862	0.259

Figure 1. mosquito surveillance of JE in Taiwan, 2012

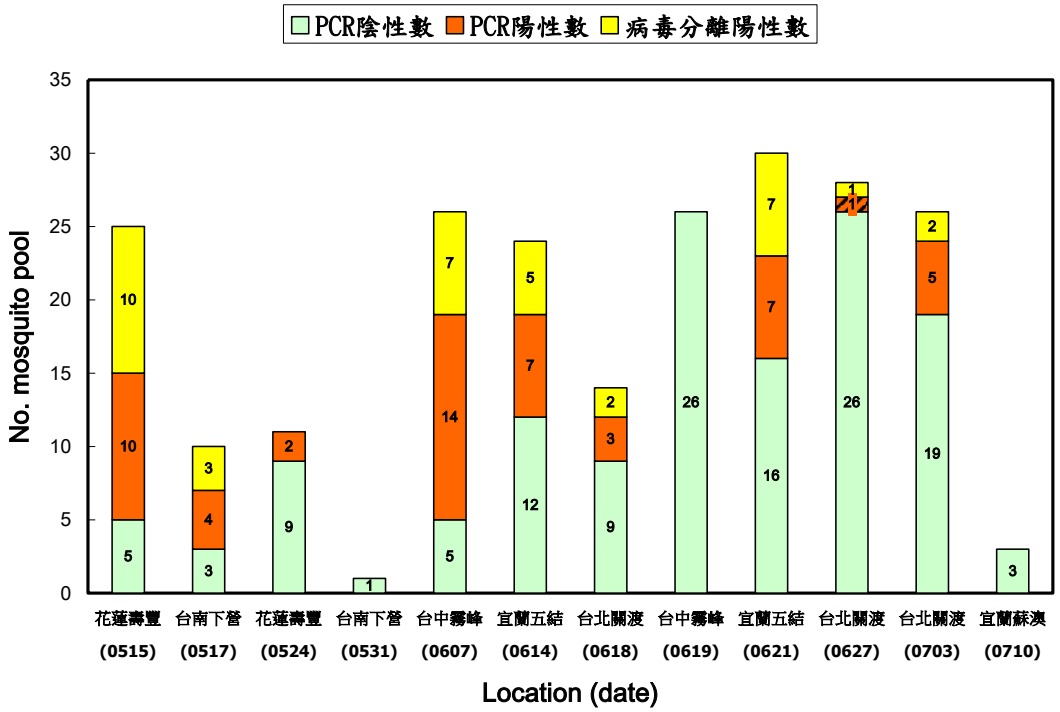


Figure 2. Phylogenetic analysis of JEV genotype I strains.

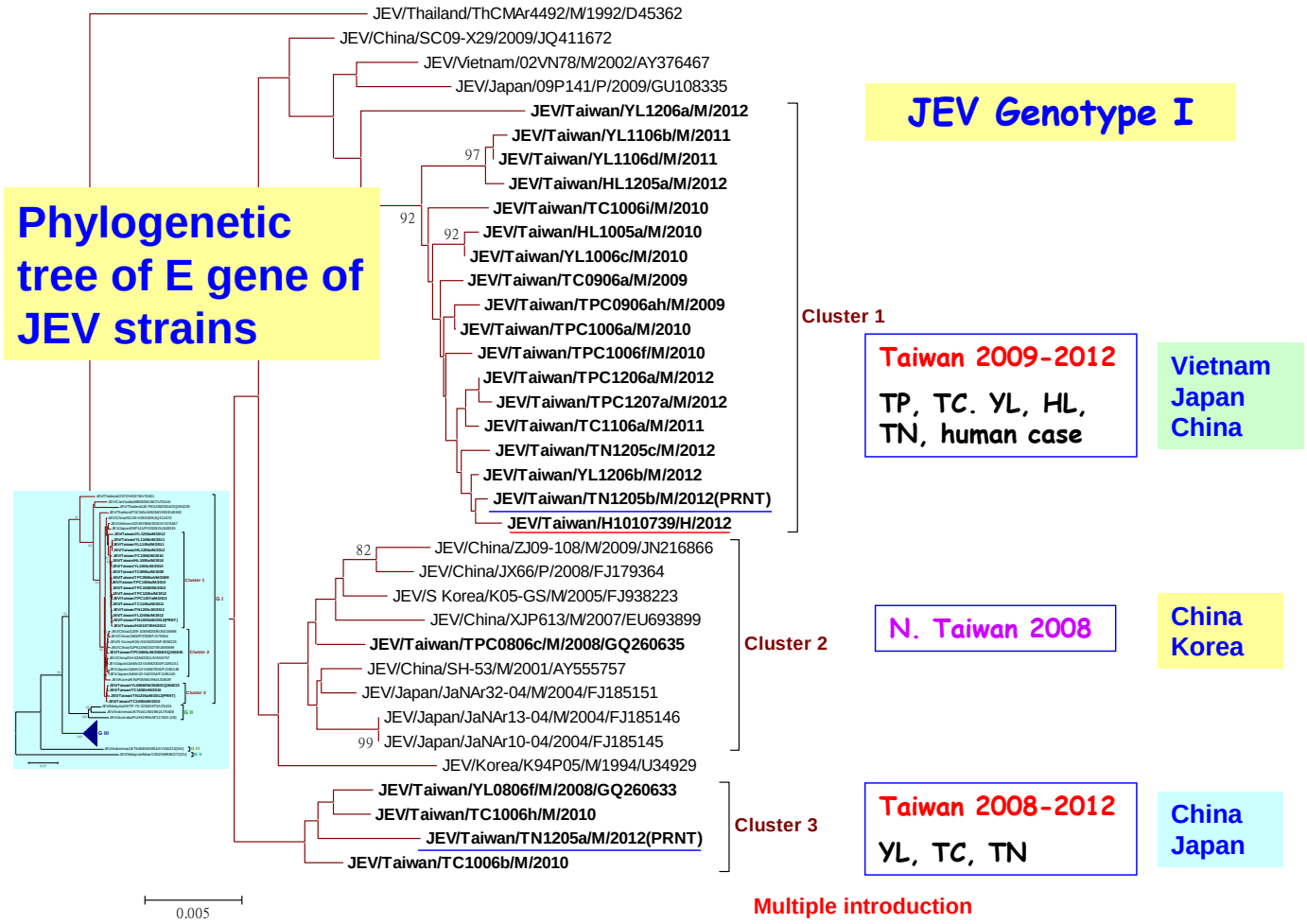


Figure 3. Phylogenetic analysis of JEV genotype III strains.

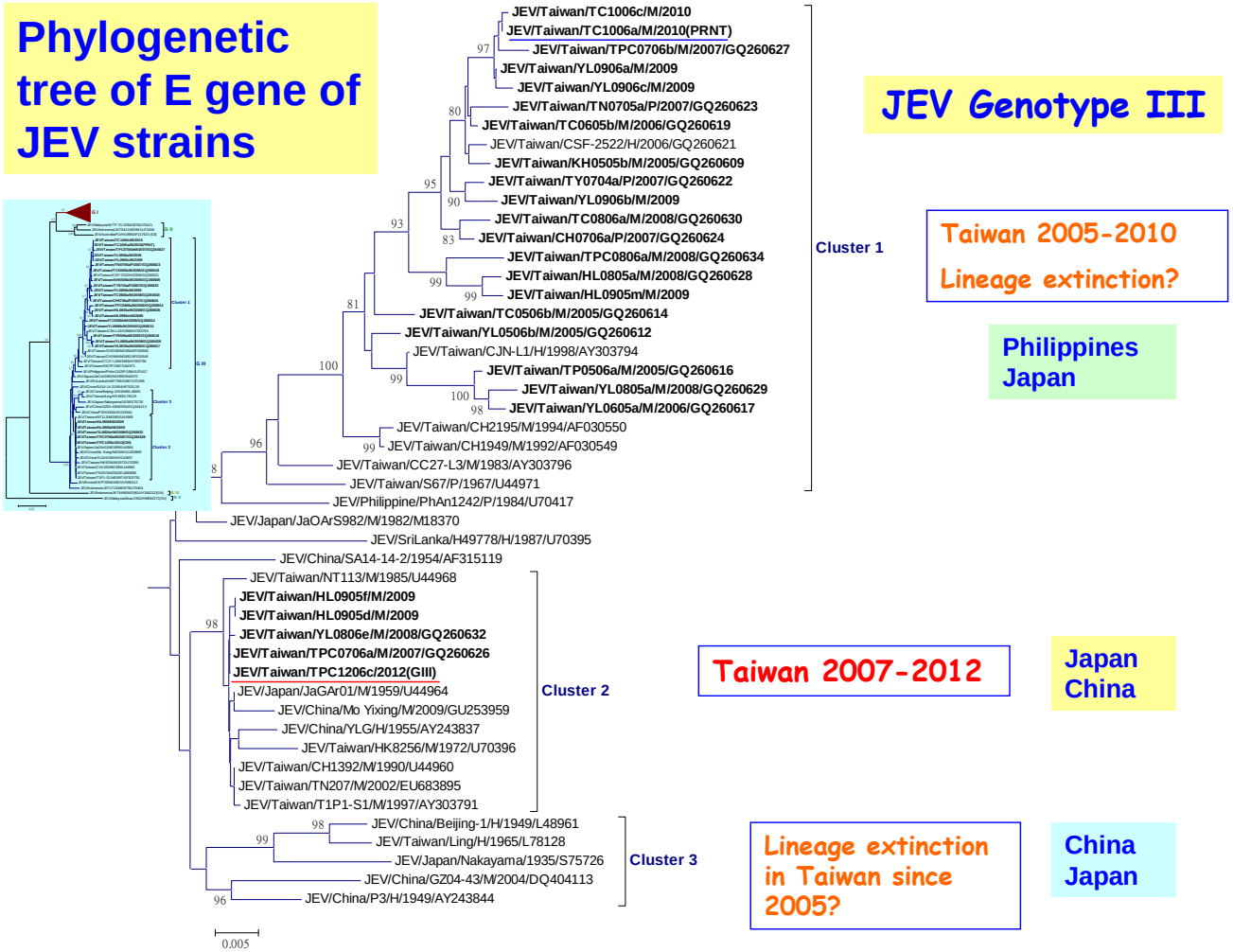


Figure 4. Neutralizing antibodies against JEV in JE patients and normal persons.

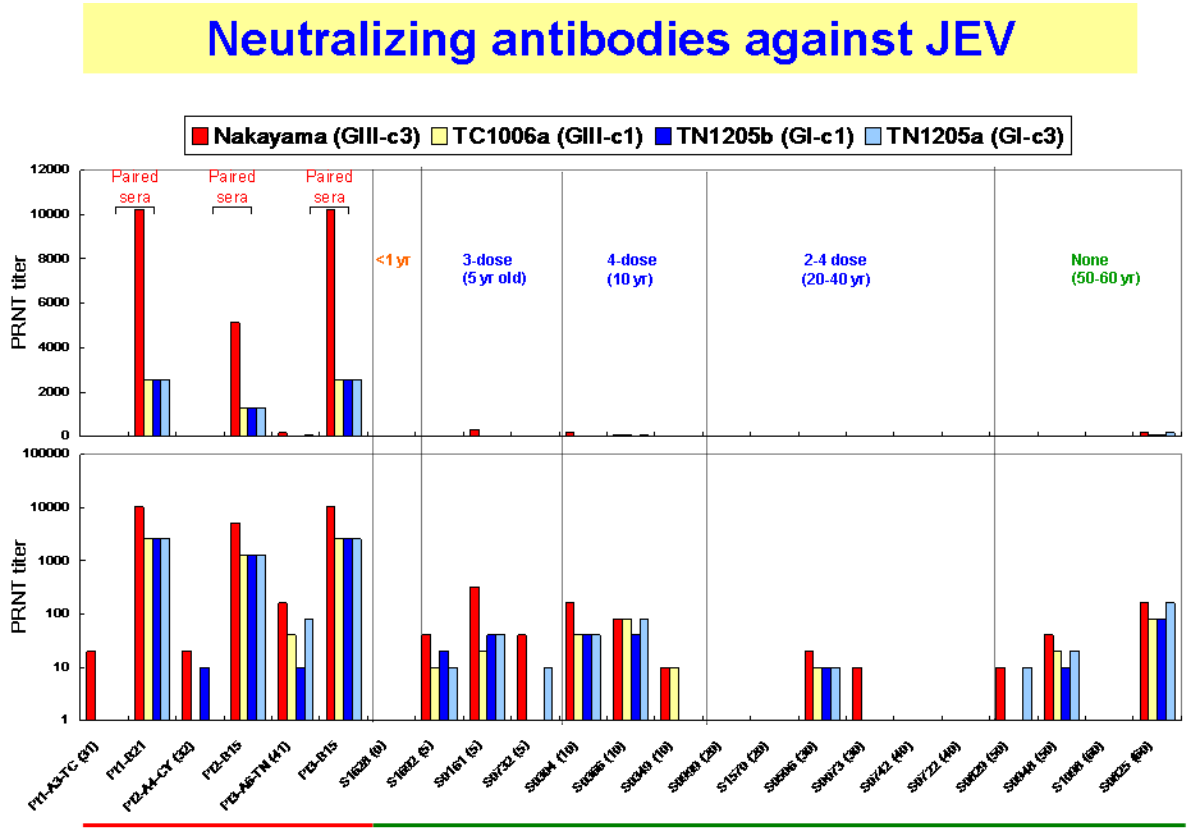


Figure 5. Comparison between PRNT and E/M-specific indirect IgG ELISA in JE patients.

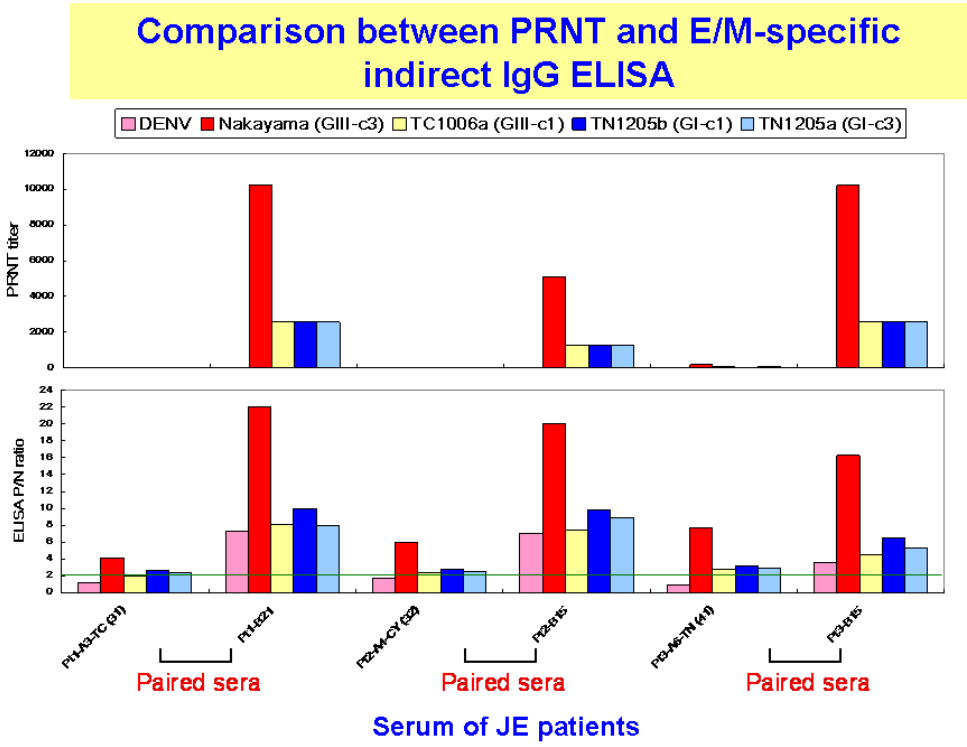
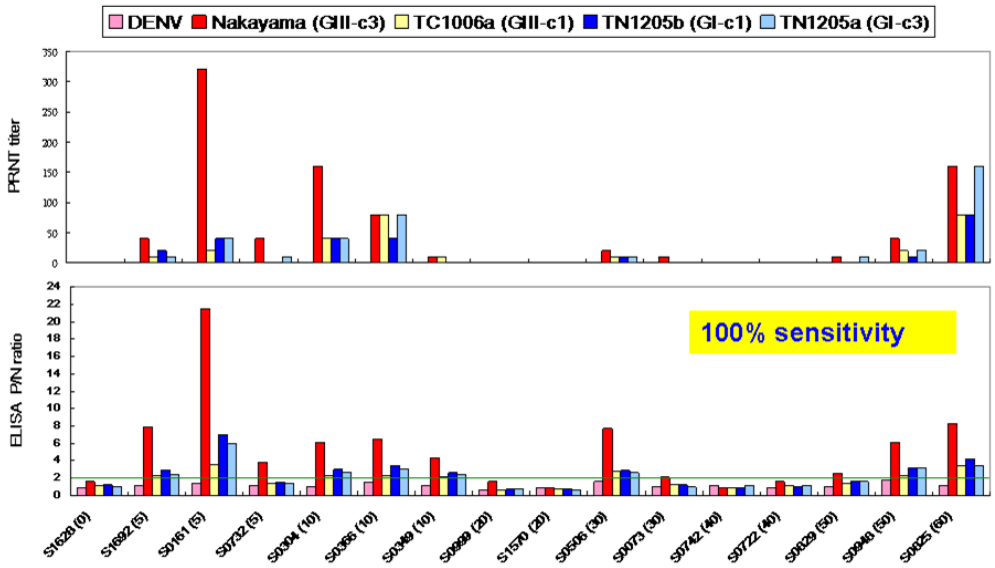



Figure 6. Comparison between PRNT and E/M-specific indirect IgG ELISA in normal persons.