

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000205

行政院衛生福利部疾病管制署 103 年度科技研究發展計畫

台灣地區登革病毒及其他病媒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、陳育瑜、張梅君、胡懷菁、張淑芬

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 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)
英文摘要	(4)
本文	
(1) 前言	(5-8)
(2) 材料與方法	(9-10)
(3) 結果	(11-12)
(4) 討論	(13-14)
(5) 結論與建議	(15-16)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(17)
(7) 參考文獻	(18-19)
表次	(20-22)
圖次	(23-30)
	共 (30)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(DENV)感染所引起。由分子流行病學及病毒基因親緣分析顯示，台灣登革熱流行主要是由每年從境外引入新的登革病毒株所造成，流行從夏季開始至冬季結束，少數登革病毒株可越冬，在隔年春夏天再度造成流行。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。結果顯示今年(2014年)疫情主要發生在高雄市，首例登革熱在五月中旬出現於高雄市前鎮區，六月上旬病毒已擴散至旗津、小港、鳳山及林園等區，截至 2014/11/12 止，高雄市登革熱病例已達 10,617 例，以三民區 2,811 例最多，其次前鎮區 1,605 例、鳳山區 1,583 例、苓雅區 1,212 例。其他縣市的病例主要是在高雄市感染，包括屏東縣 139 例、台南市 75 例及新北市 13 例等。這波流行主要由一第一型登革病毒株 (DENV-1) 所引起，病毒來源為印尼。此外有一散發病例居住於高雄市岡山區，由另一株 DENV-1 所感染，病毒來源為菲律賓。境外移入病例之來源國家以馬來西亞最多(60 例)，其次為印尼(55 例)、菲律賓(31 例)及中國大陸(19 例)。

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。由病媒蚊監測結果顯示日本腦炎病毒除了一株為第三基因型病毒外，其餘 14 株均屬於第一基因型病毒，顯示台灣目前的日本腦炎病毒以第一基因型之病毒為主。

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 neighboring countries is responsible for the local outbreaks each year. Because of the low mosquito density in the winters, outbreaks during winter were rare. In 2014, an epidemic DENV-1 strain caused large outbreak in southern Taiwan. From May to Nov. 12, 2014, there were 10,617 indigenous dengue cases in Kaohsiung City, 136 cases in Pingtung County, 75 cases in Tainan City and 13 cases in New Taipei City. Epidemic virus is likely introduced from Indonesia. A total of 208 imported dengue cases were identified this year, travelers were arriving from 16 countries. Malaysia (60 cases), Indonesia (55 cases), the Philippines (31 cases) and China (19 cases) were the most frequent importing countries.

Japanese encephalitis (JE) is wide spread in Asia and is an endemic disease in Taiwan. Our surveillance data in mosquitoes showed that except a genotype III strain identified in Hualien County, all of the JEV strains identified in Taiwan belonged to genotype I in 2014.

Keyword : Vector-borne infectious diseases, 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 [Capsid, Premembrane/Membrane (prM), Envelope (E)] 與 7 個非結構基因 [Non-structural protein 1 (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。全球每年約有五千萬至一億人被登革病毒感染，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國，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。登革熱雖非台灣本土性流行疾病，但因每年均有大量的境外病毒引進，近 10 年來台灣每年都有登革熱的流行 (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具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。由於預防注射的有效實施，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, 13)。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 (14-16)，1990 年以前，Genotype III 病毒株是亞洲主要的流行株。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 (17-20) 等地，並逐漸取代 Genotype III 病毒株。Nabeshima 等人報告 Genotype I 病毒株常自東南亞和東亞大陸引進日本 (21)，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 (22)。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基因型與地理分佈並不清楚。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)。2009-2013 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，僅少數地方之日本腦炎病毒屬於 Genotype III。由 E 基因分析結果顯示 Genotype I 日本腦炎病毒已取代 G III 成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型。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 2014 年具有代表性的台灣本土流行病毒株，探討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，病毒的鑑定方法可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 鑑定病毒的種類及血清型別。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的方法，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 μ L 緩衝液中研磨均質化，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 μ 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 μ 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 2 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' 。
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 (23)：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ 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 6 (<http://www.megasoftware.net/>) 進行核酸序列比對及演化親源性分析。

結果

- 1. 2014 年台灣地區登革熱本土流行之分析結果：**2014 年 1-2 月中，有 14 例本土登革熱病例包括屏東縣 9 例、台南市 4 例及高雄市 1 例，為 2013 年登革熱疫情之延續。2014 年從 5 月開始登革熱進入流行季節，病例首先出現在高雄市前鎮區(首例發病日 5/13)，很快地又在小港(首例發病日 5/22)、旗津(首例發病日 5/28)、林園(首例發病日 5/29)、鳳山(首例發病日 6/6)等區出現確定病例，推測病毒可能已流行一段時間並散播至高雄市多處地區。登革熱病例數由 5 月的 12 例確定病例到 6 月的 93 例，迅速攀升至 7 月 379 例、8 月 957 例、9 月 2,247 例、10 月 5,329 例。截至 2014/11/12 止，高雄市登革熱病例已達 10,617 例，以三民區 2,811 例最多，其次前鎮區 1,605 例、鳳山區 1,583 例、苓雅區 1,212 例。其他縣市的病例主要是在高雄市感染，包括屏東縣 139 例、台南市 75 例及新北市 13 例等。台灣共有 10,905 登革熱病例、87 例登革出血熱病例中有 13 例死亡，是台灣 1987 年以來最大規模的登革熱流行。流行的病毒株為 DENV-1，其 E gene 核酸序列與 2014 年一印尼境外移入 DENV-1 序列相同，屬於 genotype I。此外在高雄市岡山區一登革熱病人檢體中分離出另一 DENV-1 病毒株，比對 E gene 核酸序列，推測來源為菲律賓，屬於 genotype II(圖一、二)。
- 2. 2014 年 1 月至 11 月 12 日止，台灣共有 210 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馬來西亞 (60 例)、印尼 (55 例)、菲律賓 (31 例)、中國大陸 (19 例)、新加坡 (9 例)、泰國 (8 例)、越南 (7 例)、緬甸 (7 例) 等，其中 103 例(占 49%)是由機場篩檢出來。境外移入病毒以 DENV-1 最多，其次為 DENV-2、DENV-3 及 DENV-4。DENV-1 之境外移入病毒中，印尼病毒株屬於 genotype I (GI)，馬來西亞病毒株以 GI 為主，但亦有 GII 及 GIII 病毒株。菲律賓

株屬於 GII。中國大陸則有 GI 及 GIII 病毒(圖三)。DENV-2 境外移入病毒中，馬來西亞、印尼、菲律賓、新加坡、泰國、吐瓦魯及沙烏地阿拉伯均屬於 cosmopolitan genotype，只發現一株緬甸病毒屬於 Asian 1 genotype (圖四)。DENV-3 境外移入病毒中，印尼及菲律賓病毒屬於 GI，柬埔寨病毒屬於 GII (圖五)。DENV-4 境外移入病毒中，泰國、緬甸及越南病毒屬於 GI，印尼及菲律賓病毒屬於 GII (圖六)。

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 19,919 隻病媒蚊，分為 549 池 (pool)，以 RT-PCR 篩選 JEV 陽性檢體，並進行日本腦炎病毒分離(表四、圖七)。共有 38 池為 JEV 陽性，分離出 15 株日本腦炎病毒。仍以三斑家蚊為最主要的病媒蚊，其 JEV 的感染率為千分之 4.25 (CI95%: 3.06-5.78)。圖八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，2014 年間所分離到的日本腦炎病毒株除了在花蓮有一株屬於 GIII 外，其餘在台灣南部、東部及北部的日本腦炎病毒株皆屬於 GI。GI 日本腦炎病毒株可分為二個族群 (Cluster)。Cluster 1 與 2 之病毒株皆已分佈於全台灣，病毒與中國大陸、越南、日本病毒相似。GIII 病毒株屬於 Cluster 2，與 2012 年台北關渡之病毒株極為相似。目前台灣日本腦炎病毒的基因型別主要為 GI，但亦存在少量的 GIII。

討論

2014年截至11月12日為止，台灣地區共有10,905例本土登革熱病例，87例登革出血熱及13例死亡，是台灣1987年以來最大規模的登革熱流行。流行自5月開始在高雄市前鎮區出現病例，很快又在小港、旗津、林園、鳳山等區出現病例，顯示病毒已流行一段時間並散播至高雄市多處地區。此次流行的病毒株與今年4月居住於高雄市苓雅區的一印尼境外移入病例分離出之DENV-1的E gene序列完全相同。由於台灣與鄰近東南亞各國經貿旅遊往來密切，而東南亞各國又為登革熱盛行的地區，所以台灣全年皆有來自東南亞各國之登革病毒的引進。因埃及斑蚊為登革病毒的主要傳播病媒蚊，分布於南台灣，在3-4月時，南台灣氣候開始溫暖，蚊子密度漸漸增加，一旦境外移入病例被本地蚊子叮咬後，很容易傳播病毒進而造成本土的流行。今年登革熱流行的特徵為：(1) 流行較往年為早，可能在4月即已開始流行；(2) 登革熱首例發現後，很快又在其他地區也出現病例，可見病毒已擴散，使防治工作加倍困難；(3) 2014/7/31至8/1在高雄市前鎮區與苓雅區發生多起石化氣爆炸事件，使防治工作更加困難；(4) 至11/12為止已有10,905例登革熱病例，高居歷年之冠。

截至2014/11/12止，共有210例境外移入病例，今年(2014年)同期登革熱境外移入病例，與2012及2013年相近。境外移入病例共來自16個國家，其中以馬來西亞最多、印尼次之、再其次為菲律賓及中國大陸。本土流行的主要病毒株來自印尼，另一株則只在一散發病例分離出，來自菲律賓。

日本腦炎病毒依據E基因分析可分成5種基因型別(GI-GV)。1990年以前，GIII病毒株一直是亞洲主要的流行株。然而，在過去20年間GI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 GIII 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 GIII。2008 年間，首度在台灣發現 GI 日本腦炎病毒株。JEV GI 病毒在 2009-2013 年間快速取代 GIII。今年（2014 年）台灣南部、東部及北部的日本腦炎病毒株皆屬於 GI，只有在花蓮發現一株 GIII。由於 2005-2014 年期間，日本腦炎的病例數每年皆在 17-37 例之間，並不因為病毒基因型的轉變而有明顯的變化。故目前觀察到的基因型改變似乎不會影響疫苗的保護力及日本腦炎的發生率。

結論與建議

由於交通便捷及氣候變遷等因素，各種新興及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並鼓勵醫師通報疑似病例，以及時篩檢出有傳播力的病患，減少病原體因境外移入而造成本土流行。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，為一種有效的偵測境外病毒的方法。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，如未通報及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，帶有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。

今年登革熱流行的特徵為：(1) 流行較往年為早，可能在4月即已開始流行；(2) 登革熱首例發現後，很快又在其他地區也出現病例，可見病毒已擴散，使防治工作加倍困難；(3) 2014/7/31至8/1在高雄市前鎮區與苓雅區發生多起石化氣爆炸事件，使防治工作更加困難；(4) 至11/12為止已有10,905例登革熱病例，高居歷年之冠。未來應加強登革熱病人的主動發現及醫師的早期通報，早期發現病例並積極地進行防治工作。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

2014年5-11月間共有2株登革病毒(皆為DENV-1)在台灣流行,主要發生在高雄市。首例出現於前鎮區,並散播至高雄市及其他縣市,病毒株來源為印尼。另一病毒株,在高雄市岡山區一登革熱散發病例檢體中分離出,來源為菲律賓。境外移入病例之感染國家以馬來西亞最多,其次為印尼、菲律賓及中國大陸。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,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年首先在台灣北部分離出少數GI病毒株,但在2009-2013年間病毒株已大部分屬於GI,只有少數GIII病毒株被發現,顯示GI病毒株已成為台灣主要的日本腦炎病毒基因型。在2014年日本腦炎病毒監測中,只偵測到一株GIII病毒,其餘皆為GI病毒株,病毒株的來源可能為中國大陸及日本。基因型的改變目前似乎不會影響疫苗的保護力及日本腦炎的發生率,但仍有待繼續研究。

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. Su CL, Yang CF, Teng HJ, Lu LC, Lin C, Tsai KH, Chen YY, Chen LY, Chang SF, Shu PY. 2004. Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis

- Virus in Mosquitoes in Taiwan during 2005-2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 2;8(10):e3122.
14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 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. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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 2014 (2014/01/01-2014/10/20)							
Country	Case	Fever screening	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Subtotal
Indonesia	53	30	12(12)	9(7)	16(13)	2(2)	39(34)
Malaysia	51	29	18(17)	19(11)	1(0)	-	38(28)
Philippines	28	11	7(7)	4(4)	1(1)	4(4)	16(16)
China	16	6	8(2)	-	-	-	8(2)
Singapore	8	6	4(3)	2(2)	-	-	6(5)
Myanmar	7	2	2(1)	1(1)	-	1(1)	4(3)
Thailand	6	1	-	2(1)	-	1(1)	3(2)
Vietnam	6	3	1(1)	1(0)	-	1(1)	3(2)
Cambodia	2	-	-	-	1(1)	-	1(1)
India	2	2	1(1)	-	-	-	1(1)
Bangladesh	2	-	1(0)	-	-	-	1(0)
Nauru	2	-	-	-	-	-	-
French Polynesia	1	-	-	-	-	-	-
Tuvalu	1	1	-	1(1)	-	-	1(1)
Saudi Arabia	1	-	-	1(1)	-	-	1(1)
Japan	1	-	-	-	-	-	-
Total	187	91	54(44)	40(28)	19(15)	9(9)	122(96)

Table 3.

Summary of genotype distributions of DENV strains isolated from imported cases in Taiwan, 2014 (2014/01/01-2014/10/20)											
Serotype	DENV-1			DENV-2		DENV-3			DENV-4		Total
	I	II	III	Cosmopolitan	Asian 1	I	II	III	I	II	
Indonesia	12	0	0	7	0	13	0	0	0	2	34
Malaysia	13	1	3	11	0	0	0	0	0	0	28
Philippines	0	7	0	4	0	1	0	0	0	4	16
Singapore	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5
Myanmar	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3
Thailand	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
China	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Vietnam	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
India	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cambodia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Tuvalu	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Saudi Arabia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	28	8	8	27	1	14	1	0	3	6	96

Table 4. The maximal likelihood estimates (MLEs) of the JEV infection rate in mosquitoes

Species	Infection Rate	Lower Limit	Upper Limit	Scale	Point Est Method	CI Method	Num Pools	Num Pos Pools	Num Individuals
<i>Aedes aegypti</i>	0.00	0.00	545.52	1,000	MLE	Score	1	0	2
<i>Aedes albopictus</i>	0.00	0.00	6.87	1,000	MLE	Score	27	0	500
<i>Aedes penghuensis</i>	0.00	0.00	231.16	1,000	MLE	Score	1	0	6
<i>Aedes vexans</i>	0.00	0.00	325.85	1,000	MLE	Score	1	0	4
<i>Anopheles sinensis</i>	0.00	0.00	31.11	1,000	MLE	Score	4	0	62
<i>Anopheles tessellatus</i>	0.00	0.00	17.48	1,000	MLE	Score	11	0	158
<i>Armigeres subalbatus</i>	0.00	0.00	16.83	1,000	MLE	Score	18	0	195
<i>Culex annulus</i>	0.00	0.00	0.91	1,000	MLE	Score	103	0	4120
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	0.00	0.00	319.26	1,000	MLE	Score	2	0	5
<i>Culex brevipalpis</i>	0.00	0.00	127.14	1,000	MLE	Score	6	0	20
<i>Culex fuscus</i>	0.00	0.00	657.62	1,000	MLE	Score	2	0	2
<i>Culex fuscocephala</i>	0.00	0.00	391.79	1,000	MLE	Score	2	0	4
<i>Culex mimeticus</i>	0.00	0.00	793.45	1,000	MLE	Score	1	0	1
<i>Culex murrelli</i>	0.00	0.00	32.22	1,000	MLE	Score	4	0	69
<i>Culex pipiens</i>	0.00	0.00	3.30	1,000	MLE	Score	36	0	1082
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0.00	0.00	1.06	1,000	MLE	Score	92	0	3543
<i>Culex sitiens</i>	0.00	0.00	10.22	1,000	MLE	Score	8	0	292
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	4.25	3.06	5.78	1,000	Bias Corrected MLE	Corrected Score	221	38	9814
<i>Forcipomyia taiwana</i>	0.00	0.00	793.45	1,000	MLE	Score	1	0	1
<i>Mansonia uniformis</i>	0.00	0.00	73.75	1,000	MLE	Score	6	0	37
<i>Tripteroides bambusa</i>	0.00	0.00	657.62	1,000	MLE	Score	2	0	2
Total							549	38	19919

Figure 1

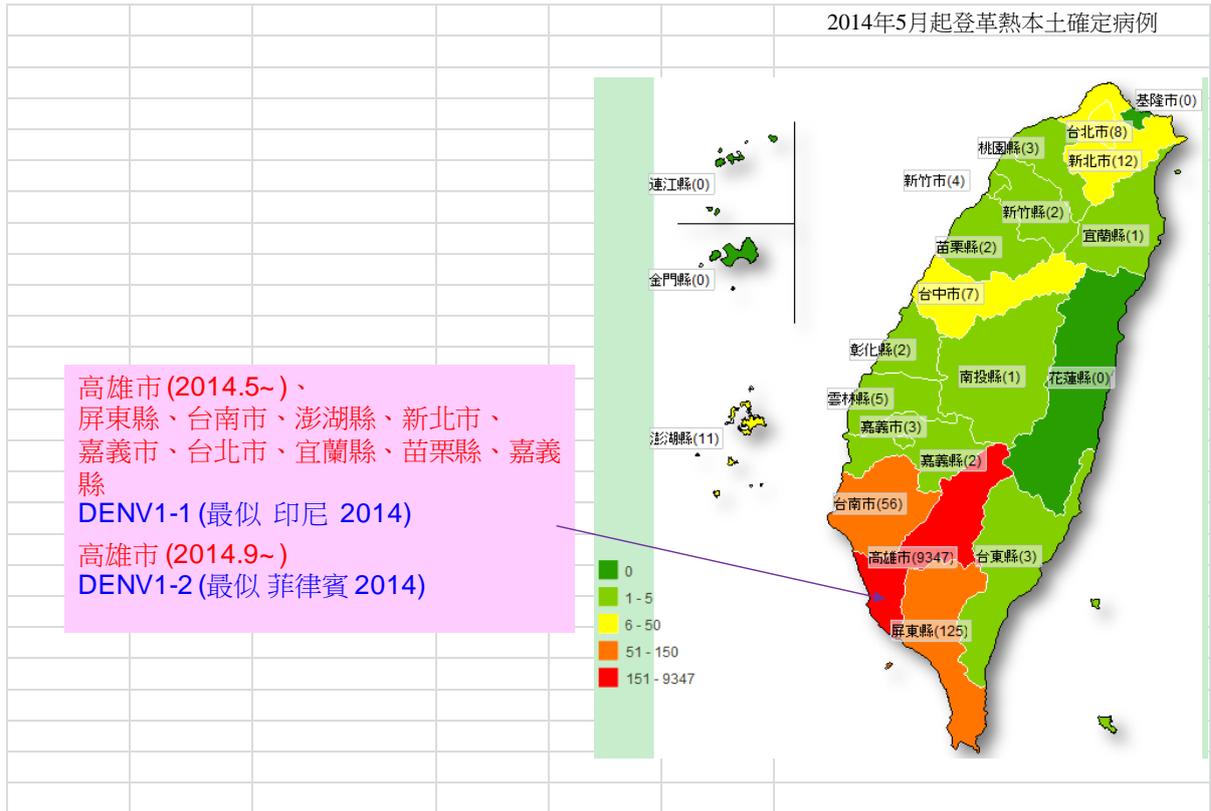


Figure 2. Phylogenetic tree of DENV-1, Indigenous cases

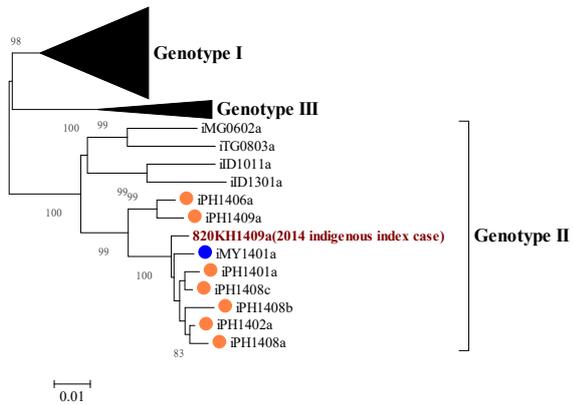
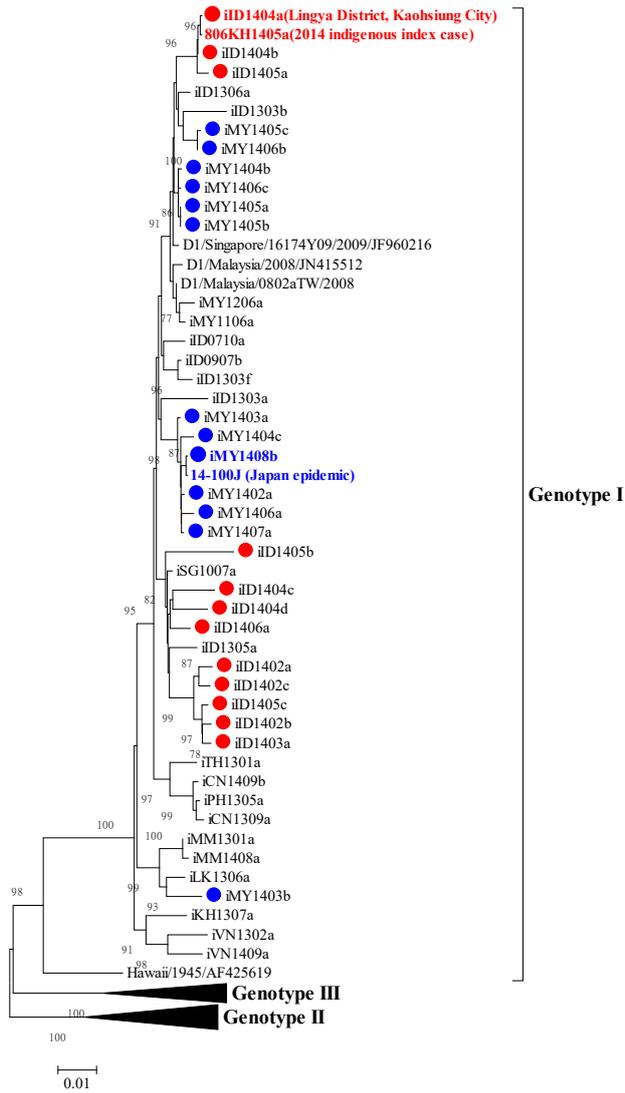


Figure 3. Phylogenetic tree of E gene of DENV-1

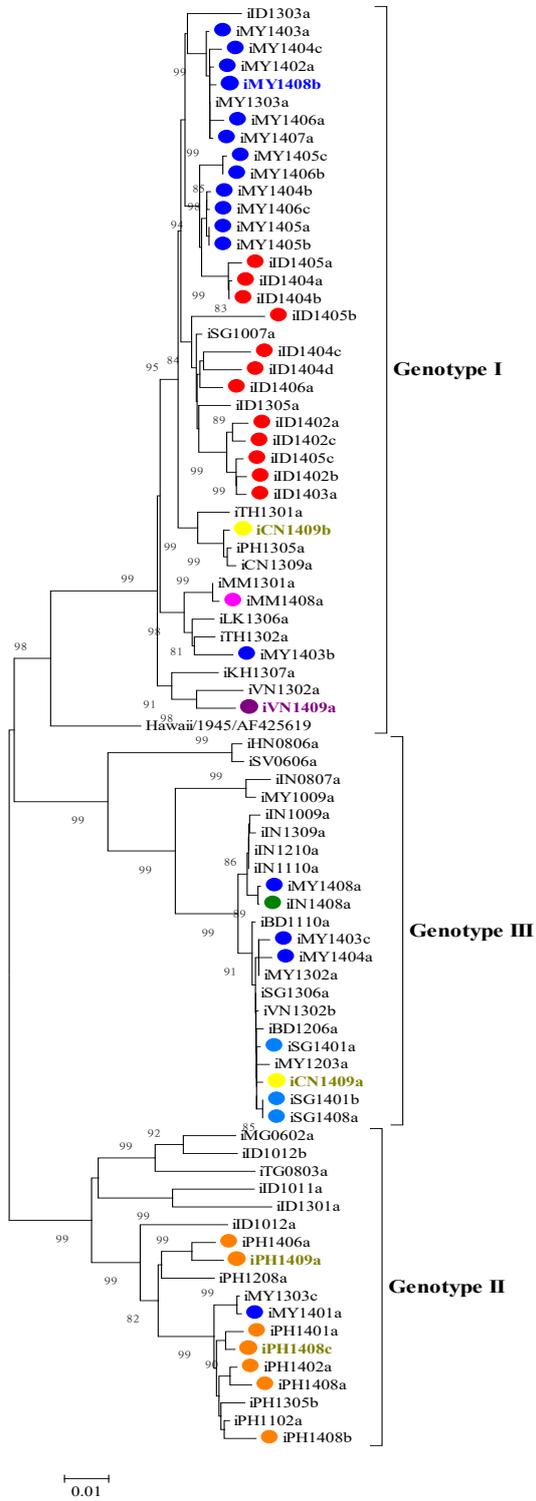
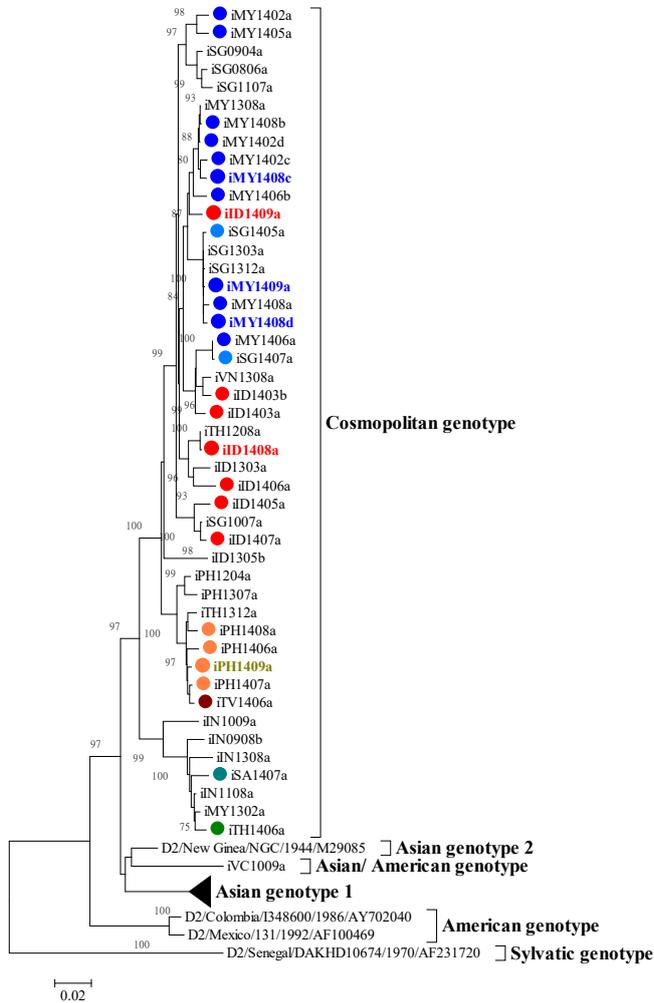


Figure 4. Phylogenetic tree of E gene of DENV-2



Asian 1 genotype

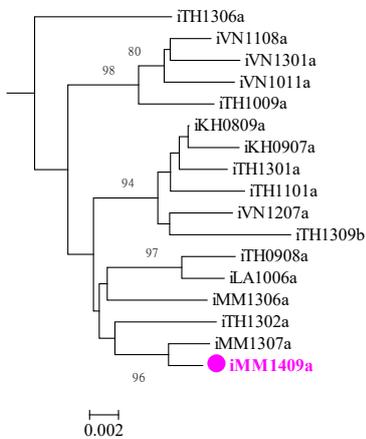


Figure 5. Phylogenetic tree of E gene of DENV-3

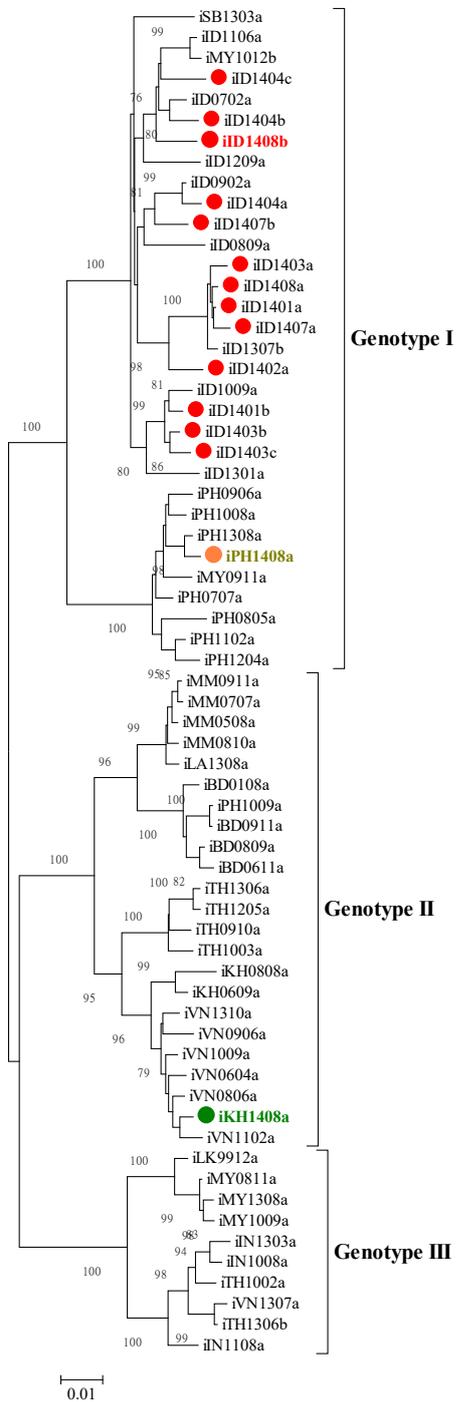


Figure 6. Phylogenetic tree of E gene of DENV-4

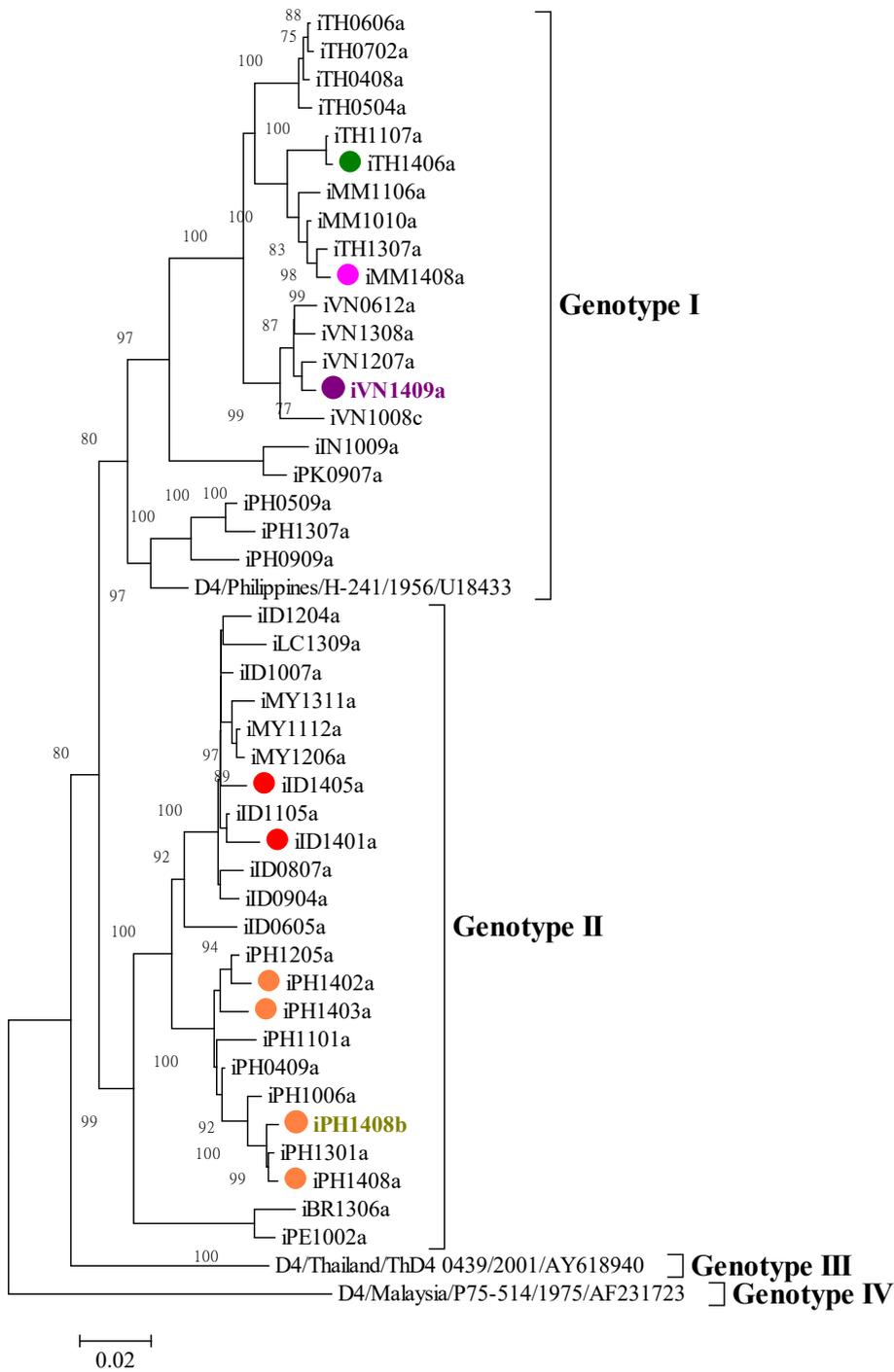
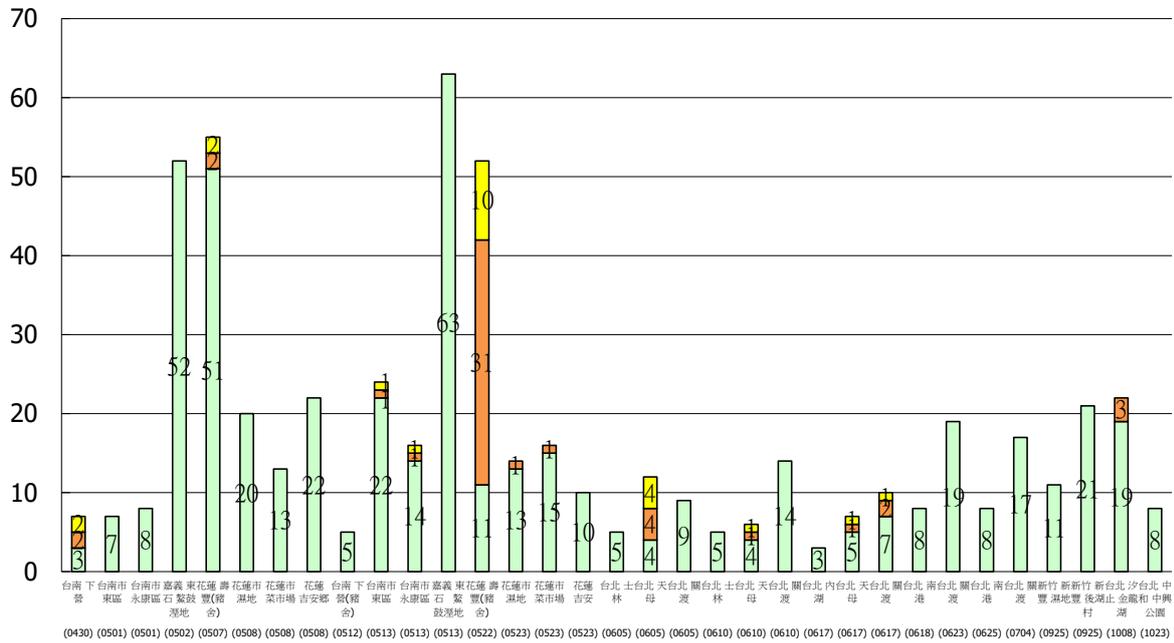


Figure 7.



ID	Location	PCR陰性數	PCR陽性數	V.I陽性數	蚊子pool數
(0430)	台南 下營	3	2	2	5
(0501)	台南市 東區	7	0	0	7
(0501)	台南市 永康區	8	0	0	8
(0502)	嘉義 東石 鰲鼓溼地	52	0	0	52
(0507)	花蓮 壽豐(豬舍)	51	2	2	53
(0508)	花蓮市 濕地	20	0	0	20
(0508)	花蓮市 菜市場	13	0	0	13
(0508)	花蓮 吉安鄉	22	0	0	22
(0512)	台南 下營(豬舍)	5	0	0	5
(0513)	台南市 東區	22	1	1	23
(0513)	台南市 永康區	14	1	1	15
(0513)	嘉義 東石 鰲鼓溼地	63	0	0	63
(0522)	花蓮 壽豐(豬舍)	11	31	10	42
(0523)	花蓮市 濕地	13	1	0	14
(0523)	花蓮市 菜市場	15	1	0	16
(0523)	花蓮 吉安	10	0	0	10
(0605)	台北 士林	5	0	0	5
(0605)	台北 天母	4	4	4	8
(0605)	台北 關渡	9	0	0	9
(0610)	台北 士林	5	0	0	5
(0610)	台北 天母	4	1	1	5
(0610)	台北 關渡	14	0	0	14
(0617)	台北 內湖	3	0	0	3
(0617)	台北 天母	5	1	1	6
(0617)	台北 關渡	7	2	1	9
(0618)	台北 南港	8	0	0	8
(0623)	台北 關渡	19	0	0	19
(0625)	台北 南港	8	0	0	8
(0704)	台北 關渡	17	0	0	17
(0925)	新竹 新豐 濕地	11	0	0	11
(0925)	新竹 新豐 後湖村	21	0	0	36
(1008)	台北 汐止 金龍湖	19	3	0	22
(1023)	台北 中和 中興公園	8	0	0	8

Figure 8. Phylogenetic analysis of E gene of JEV strains.

