

計畫編號：DOH 98-DC-2010

行政院衛生署疾病管制局九十八年度

自行研究計畫

病媒性傳染病之主動監測與實驗室診斷

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：黃智雄

研究人員：舒佩芸、楊正芬、蘇千玲、廖采苓、張淑芬、鄭佳欣、胡懷
菁、徐同慶、楊智翔、林建州、楊文志、施秀、簡大任、吳
和生、

執行期間：98年1月1日至98年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-8)
(2) 材料與方法	(9-12)
(3) 結果	(13-16)
(4) 討論	(17-18)
(5) 結論與建議	(19)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(20)
(7) 參考文獻	(21-27)
三、表次	(28-33)
四、圖次	(34-38)
	共 (38) 頁

中文摘要

本年度我們配合機場發燒篩檢系統，擴大監測節肢動物媒介病毒與立克次體菌，利用即時螢光定量 PCR/RT-PCR (Real-time PCR/RT-PCR) 方法為基礎的多重病毒/立克次體菌分子檢驗系統，檢測各種重要的病媒性傳染病。我們也將登革熱 NS1 抗原快速檢驗試劑，擴大使用於機場發燒篩檢系統及醫院通報系統，以提高檢驗效能。至今 (11 月 30 日止)，本年度在機場發燒篩檢部份，共檢測出 107 例境外移入登革熱患者 (另有醫師通報病例 83 例) 及 5 例屈公病患者 (另有醫師通報病例 2 例)，但尚未檢測出立克次體菌陽性患者。在 RT-PCR 陽性境外移入患者中，登革病毒主要為第一型共 50 例、其次為第二型共 38 例、第三型共 22 例、及第四型共 13 例。綜合研究結果顯示，自 97 年 6 月 18 日起至今，以 RT-PCR 或 NS1 抗原快篩所檢驗出之 200 例急性期/早恢復期血清 (1-10 天) 陽性確定病例中，61% 為 RT-PCR(+)NS1Ag(+)、19% 為 RT-PCR(+)NS1Ag(-)、及 20% 為 RT-PCR(-)NS1Ag(+)，顯示 RT-PCR 檢驗 (1-7 天血清) 及 NS1 抗原快篩檢驗 (1-10 天血清) 都會遺漏部分陽性檢體，在登革熱急性期/早恢復期血清快速檢驗上十分重要，有助於患者之早期診斷與治療、疫情之監測與緊急防治工作。我們的研究結果也顯示各種登革病毒、E1-226A 與 E1-226V 中/東/南 非洲基因型印度株、及亞洲基因型印尼株屈公病毒已在印度及東南亞地區擴散。目前，包括印度各地、印尼、新加坡、馬來西亞、泰國、與越南等地都已經成為登革熱、日本腦炎、及屈公病共同流行地區。未來，極有可能在台灣，尤其是在南部地區，造成登革熱、日本腦炎、與屈公病共同流行，成為公共衛生防疫上的重大問題，應積極加強監測。

關鍵詞：病媒性傳染病、節肢動物媒介病毒、發燒篩檢、登革熱、屈公病、登革熱快速檢驗試劑

英文摘要： This year we expand the airport fever screening surveillance system by monitoring arboviruses and Rickettsia using real-time PCR/RT-PCR method based on multiplex virus/Rickettsia molecular testing systems. In addition, we expand the evaluation of dengue NS1 antigen rapid test kit on both airport fever screening and clinician report systems. Until November 30, we had detected 107 imported dengue cases (another 83 cases by clinician report system), and 5 imported chikungunya cases (2 additional cases by clinician report system), but has not yet detected imported Rickettsia case. Among RT-PCR-positive patients, there are 50 DENV-1 cases, 38 DENV-2 cases, 22 DENV-3 cases, and 13 DENV-4 cases. In summary, among 200 acute phase / early convalescent serum (1-10 days) from confirmed dengue cases tested positive by RT-PCR or the NS1 dengue virus antigen rapid test, 61% were RT-PCR (+) NS1Ag (+), 19% were RT-PCR (+) NS1Ag (-), and 20% were RT-PCR (-) NS1Ag (+). The results showed that both RT-PCR test (1-7 days of serum) and the NS1 antigen rapid test (1-10 days of serum) are valuable in early dengue diagnosis and patient management, disease surveillance, and emergency control measures. Our results also show that a variety of dengue viruses, E1-226A and E1-226V Central / East / South African genotype Indian strains, and Asian genotype Indonesian strains of chikungunya virus had spread to India and Southeast Asia. Currently, are endemic diseases in various areas of India, Indonesia, Singapore, Malaysia, Thailand, and Vietnam. In the future, Taiwan may have co-circulation of dengue fever, Japanese encephalitis, and chikungunya, particularly in the southern region, leading to major public health problem. Enhanced surveillance is needed to reduce the potential threat in the future.

Keyword: Arbovirus, fever screening at airport, dengue fever, chikungunya fever, dengue NS1 antigen rapid test, Rickettsia.

前言

由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率日益頻繁與嚴重，其中又以蚊蟲 (mosquito) 及壁蝨 (Tick) 所媒介的節肢動物媒介病毒 (arthropod-borne viruses, Arbovirus) 傳染病最重要。Wilson 等人報告於 1997-2006 年間從 GeoSentinel Surveillance Network 監測網分析旅遊回國發燒病患結果，顯示 6957 發燒旅遊病患中，35% 有全身性發燒，22% 為非特異性發燒，15% 有腹瀉，14% 有呼吸道症狀，及 10% 為其他診斷(1,2)。其中瘧疾最常見(主要旅遊地 tropical regions, 包括 Pacific Islands and sub-Saharan Africa)，其次為登革熱(Asia) (3)、腸道疾病(主要旅遊地 south-central Asia) 及立克次體病(主要旅遊地為 southern Africa 及 West Indies)。近年來，屈公病也成為 Indian Ocean islands off Africa and India itself 旅遊地之重要傳染病(4-7)。

目前台灣地區入境民眾每日約 25,000 至 35,000 名旅客，平均一年國人入境人次數約 800-1,200 萬人。為防範境外移入傳染病之發生及散佈，自民國 92 年 3 月 SARS 疫情開始，行政院衛生署疾病管制局針對入境旅客全面測量體溫，並於同年 7 月 14 日起，將機場的發燒篩檢列為傳染病監測系統，利用紅外線體溫偵測儀測量入境旅客的體溫。有發燒症狀者，經醫師診斷後，經由疾病管制局主動採取病人檢體，檢驗相關傳染病 (包括登革熱、腸道疾病 (主要為桿菌性痢疾及霍亂)、屈公病、瘧疾、新型流感等)。目前經機場發燒篩檢檢疫偵測，每年約有超過 20,000 入境旅客有發燒症狀 (比例約為千分之 3 至千分之 10)，約有 5,000-6000 人經採取臨床檢體送實驗室檢驗。此傳染病監測措施，成效良好，於民國 92-97 年分別檢驗出登革熱確定病例 17、57、46、48、75 及 102 人，約佔全部境外移入病例之 45%。因為這些確定病例多處於急性期，機場發燒篩檢及高效率的實驗室檢驗，可及時發現境外移入的確

定病例，進行防治工作，有效的防止病原菌的散播。利用發燒篩檢所偵測及分離出之登革病毒株及建立之基因資料庫，對分辨現有病毒或新引進病毒的傳播及監測相當重要，並有助於了解東南亞地區登革病毒的演化及流行情形。目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的監測系統之一，能有效降低傳染病的引進(8-10)。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原菌的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區、及檢驗實驗室的效能有關，93-97 年間之監測結果顯示，越南、印尼、泰國及菲律賓是主要的引進國家(11,12)。

在各種新興及再浮現傳染病中，屈公病是一個重要的例子。自 2005 年三月在印度洋的法國海外省份留尼旺島 (island of Reunion) 爆發以來，估計已有 255,000 人受感染(4)。該疫情逐漸擴大，除留尼旺島，同樣位於非洲東岸對出的塞席耳、模里西斯、馬達加斯加、葛摩群島等亦受波及，全球許多國家都有境外移入病例的報告 (4-7)，此病毒株屬於中/東/南 非洲基因型(Central/East/South African genotype 或 CES African genotype)。比較有趣的是，自 2006 年後期有另外一株 CES African genotype 開始在印度流行，並傳播到許多亞洲及歐洲國家，2007 年也產生了 E1-226(V)變異株，可有效地透過白線斑蚊傳播，如義大利曾於 2007 年發生由此變異株引起的本土流行，透過白線斑蚊傳播，共有 204 例實驗室檢驗的確定病例(13)。目前此印度株的 CES African genotype 及其 E1-226(V)變異株已傳播至印度各地、新加坡、馬來西亞、泰國、與越南等地造成本土流行(14-20, and ProMED mail)。

由於登革熱與屈公病主要的傳染媒介都是埃及斑蚊和白線斑蚊兩種病媒蚊，臨床症狀也很相似，進行鑑別診斷是十分重要的。為監測阿爾法病毒感染，我們建立了一套多重病毒、單步驟 SYBR 綠色螢光、及時 RT - PCR 檢驗方法，利用三套混合引子，包括阿爾法病毒特異性引

子、屈公病毒特異性引子、及羅斯河病毒特異性引子，用於發燒病人血清 RT - PCR 檢測。檢驗為陽性反應者，再經過基因序列分析，病毒分離，血清學試驗所確認。我們於 2006 年底首次報導由新加坡境外移入台灣的第一例屈公病例，感染東/中/南 非洲基因型屈公病毒。新加坡雖然是登革熱本土流行的地方，但以往並沒有屈公病的報導，也沒有監測的計畫，我們的發現顯示屈公病可能被誤判為登革熱。新加坡政府自 2008 年開始監測屈公病，2008 年與 2009 年均有>300 例屈公病確定病例，其中境外移入約有 50 例(16,17)。相反地，屈公病自 1973 年成為印尼的流行地方病後，於 1998 年後每年均爆發流行，這些病毒株屬於印尼的亞洲基因型。這些結果證實二種基因型屈公病毒均在亞洲地區擴散，並預測在許多亞洲和非洲國家，由於國際旅行的增加及埃及斑蚊及白線斑蚊的廣泛分佈，登革熱和屈公病之共同流行將有所增加。在台灣，白線斑蚊分佈在全島範圍，而埃及斑蚊只分佈在台灣南部，因此也有登革熱和屈公病共同流行之風險，尤其是在台灣南部。

為了使機場發燒篩檢監測系統更有效率，能及時確認病人感染，我們已開始使用 NS1 蛋白抗原快速檢驗試劑於疑似登革熱病例。在 2008 年 6 月 18 日至 9 月 12 日評估期間，我們共篩選了 850 名疑似登革熱病例，利用 RT-PCR (22,23)，NS1 蛋白抗原快速檢測 (24-26)，IgM 和 IgG ELISA (27,28)方法確定了 22 例境外移入登革熱病例(29)。這些結果顯示 NS1 蛋白抗原為基礎的登革熱快速檢驗試劑，其有助於發燒登革熱病人之及時診斷與治療，及後續的防治措施。我們目前已將 NS1 蛋白抗原快速檢驗試劑使用於例行的醫師通報系統及機場發燒主動篩檢，進行及時監測。

近年來，立克次體菌(Rickettsia)的地方性流行與國際間傳播日益增加(1,2,30)，台灣地區也有境外移入的例子(31,32)，有需要進行系統的監

測與研究。配合機場發燒篩檢系統，本計畫將評估同時監測恙蟲病，斑疹傷寒及斑點熱病原菌，避免其境外移入及本土傳播風險的成效。利用立克次體 16S rDNA，恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa type-specific antigen 及 groEL gene，斑疹傷寒及斑點熱 17 kDa gene 及 gene D 等之核酸序列設計出可偵測病人血液中立克次體之引子，再配合螢光定量 PCR 產物核酸定序，可以區分不同種類及基因型別(strain)的立克次體。

材料與方法

本計畫之實施方法主要分為三部分：(一) 利用 SYBR Green I-base 螢光定量 RT-PCR 方法，開發病媒性傳染病(節肢動物媒介病毒與立克次體菌)之分子診斷方法；(二) 節肢動物媒介病毒與立克次體菌的分離與鑑定；(三) 利用免疫螢光抗體分析法 (IFA)、酵素免疫分析法 (ELISA) 及免疫層析法(Immunochromatographic Test, ICT)，開發病媒性傳染病血清學檢驗方法。其中免疫層析法為基礎的快速檢驗試劑，為 on-site 及時檢驗，可在 15-30 分鐘內得到結果。茲將實驗方法分述如下：

(一) 利用 SYBR Green I-base 螢光定量 RT-PCR 方法，開發病媒性傳染病(節肢動物媒介病毒與立克次體菌)之分子診斷方法。

1. **血清及全血檢體及病毒株來源：**血清檢體來源為通報自疾管局之各種節肢動物媒介病毒與立克次體菌感染之血清及全血，及配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選採集之血清及全血。全部檢體 (血清或全血 3c.c.)，以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種病毒與立克次體菌之來源為購自 ATCC、由其他實驗室取得或自行分離建立的菌株。
2. **抽取 RNA 或 DNA：**(1) RNA 抽取(QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)) 及純化病毒核酸。主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與核糖核酸結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。詳細的步驟如下：首先將病人血清檢體加入溶解液，分解蛋白質等雜質，同時將核糖核酸酶去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使核糖核酸與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將核糖核酸洗脫下來。血清(140 µl)中的 RNA 依據本法萃取，最後將 RNA 溶於 70 µl 純水(Water , containing 0.02% sodium azide)。(2) DNA 抽取：利

3. **引子(Primer)的設計與合成**：引子的設計可依不同的需要而定，其功能是在有效地擴增模版 DNA 序列。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 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。目前已開發出各種不同節肢動物媒介病毒(表 1)與立克次體菌(表 2)的引子組，並將持續改進其靈敏度。
4. **SYBR Green 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鍊鎖反應 (SYBR Green Real-time RT-PCR/PCR Reaction)**：(1)使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 ul 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 ul QuantiTect RT Mix，最後加入 10 ul 檢體 RNA，反應最終體積為 50 ul。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(讀取螢光值)。(2) 以 QIAGEN QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (Cat. No. 204143) 進行 real-time PCR 檢驗全血 DNA 是否含有 *Orientia tsutsugumushi* 56kDa gene 或 *Rickettsia* 17kDa gene 以及立克次屬特有的 16s rRNA 片段。
5. **熔點曲線分析(Melting curve analysis)**：節肢動物媒介病毒部分，RT-PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、68°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。立克次體菌部分，PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、65°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。

(二) 節肢動物媒介病毒與立克次體菌的分離與鑑定：(1)病毒的分離與鑑定，係將病人血清、腦組織液(CSF)、或媒蚊均質液經 C6/36、Vero 等常用之細胞株培養至少 7 天後分離出病毒，再以病毒專一性單株抗體【如 Flavivirus-specific mAb (D56.3)、JEV group-specific (E3.3)、dengue group-specific(ATCC HB114)】等做免疫螢光染色，以鑑定分離之病毒及其血清型。(2)立克次體菌的分離與鑑定如下：將 L929 細胞接種於 shell-vial (約 8×10^4 cells/vial)，置於 37°C 、5% CO_2 培養 24 小時後進行感染；取全血檢體 1-4 ml 與等體積之 PBS 混合均勻，緩慢地沿著管壁將前述混合液加入含有 5 ml Ficoll-paque 的 15 ml 離心管；以 $2500 \times g$ 離心 20 分鐘後，取 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)；將檢體 PBMC 均勻分布感染 shell-vial 細胞 2-3 管，栓緊瓶蓋置於 32°C 培養；感染後持續觀察，如 medium 顏色過紫則更換或添加 medium；感染後 10 天，進行 IFA，觀察感染情況；抽取 DNA 進行 PCR；感染後 14 天，PCR 陽性或 IFA 陽性者，以 tip 刮起轉感染，20 天後刮起細胞分裝至抗凍管凍藏之。

(三) 利用免疫螢光抗體分析法 (IFA)、酵素免疫分析法 (ELISA) 及免疫層析法 (Immunochromatographic Test, ICT)，開發病媒性傳染病血清學檢驗方法。實驗方法如下：

1. 單株抗體之製備、純化與分析：本計畫將收集各種特異性之單株抗體。單株抗體之來源由不同管道取得，包括購買、自行生產或以合作研究方式取得。將分別用於不同型式 ELISA 及 ICT 快速檢驗試劑開發，進行鑑別診斷及分型研究。單株抗體將以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱 (Pharmacia Biotech) 純化。
2. 病毒與立克次體菌之生產與純化：節肢動物媒介病毒之體外細胞培養係利用 C6/36、Vero 等常用之細胞株生產各種節肢動物媒介病毒。經細胞培養大量生產後分裝保存於 -70°C 中，供相關計畫使用。各種節肢動物媒介病毒感染 Vero 細胞所培養之上清液也

3. **間接免疫螢光抗體分析法 (IFA)** : (1)製備抗原玻片:將病毒培養之細胞，滴在 12 孔玻璃片上，室溫中風乾後，置於-20°C 丙酮固定 10 分鐘，室溫下乾燥，此抗原抹片可保存於-20°C 冰箱中或直接染色; (2) 加入待測之血清檢體 (可做 20、40、80、160 倍連續稀釋)，置於 37°C 培養箱 30 分鐘，之後將抹片取出並以磷酸鹽緩衝液 (換三次) 洗去多餘之抗體，再以蒸餾水沖洗，在室溫中將玻璃片吹乾; (3) 將抹片加上 25 μ l 螢光標記之山羊抗人抗體 (FITC-Goat Anti-Human IgG)，置於 37°C 培養箱 30 分鐘，之後將抹片清洗後，滴上甘油緩衝液及蓋玻片以螢光顯微鏡檢查。
4. **Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法**:先以 100 μ l 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG)在 4°C 下隔夜吸附 (coating)在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液 (PBS)清洗，之後再用 200 μ l 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS)於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (blocking)。清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100 μ l 反應 1 小時。清洗後，加入 100 μ l 細胞培養的病毒抗原，在 37°C 下反應 1 小時。清洗後，加入 1/1000(v/v) 稀釋之抗病毒之單株抗體 100 μ l。反應 1 小時後，加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合物 100 μ l，於 37°C 反應 1 小時。清洗後，加入 100 μ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate)室溫作用 30 分鐘，再用 Dynatech MR700 微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。
5. **免疫層析法(Immunochromatographic Test, ICT)為基礎的快速檢驗方法**：我們評估 BioRad 生產的 dengue NS1 Ag rapid test(免疫層析法為基礎的快速檢驗試劑)，使用於例行的醫師通報系統及機場發燒篩檢，進行及時監測之效果。

結果

1. **利用機場發燒篩檢境外移入的節肢動物媒介病毒及立克次體菌：**
為有效配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患之急性期血液檢體進行例行性的篩選，我們建立了多重病毒/立克次體菌篩檢方法（multiplex real-time RT-PCR or PCR），可同時偵測各種可能引進的節肢動物媒介病毒及立克次體菌。表一為節肢動物媒介病毒的各種引子組之核酸序列，表二為立克次體菌的各種引子組之核酸序列。
2. **登革病毒的境外移入病患：**表三為 98 年（至 11 月 30 日）全台地區登革熱境外移入確定病例(共 190 名，包括醫院通報、機場發燒篩檢及其他主動通報系統)感染地之分佈與病毒血清型別，其中印尼、越南、泰國及菲律賓是主要的引進國家。在 RT-PCR 陽性境外移入患者中，登革病毒主要為第一型共 50 例、其次為第二型共 38 例、第三型共 22 例、及第四型共 13 例。圖一為 95-98 年昆陽實驗室登革熱通報數與 RT-PCR 檢驗陽性之月份分佈圖，在約 4000-5000 件疑似檢體中(主要為機場發燒篩檢主動通報系統，少數（8-10%）為醫院通報系統)，分別檢測到 70, 79, 138 及 107 例（98 年至 11 月 30 日）RT-PCR 陽性之境外移入確定病例。
3. **登革熱快速檢驗試劑(NS1 antigen rapid test)的評估：**由於 97 年於機場發燒篩檢評估使用登革熱 NS1 抗原快篩檢驗試劑之結果良好，我們已於 98 年度正式將登革熱 NS1 抗原快速檢驗試劑使用於機場發燒篩檢及醫院通報疑似登革熱病患之檢驗。表四綜合分析自 97 年 6 月 18 日起至今，利用 RT-PCR 或 NS1 抗原快篩檢驗陽性之 200 例確定病例急性期/早恢復期血清（1-10 天）結果，其中 61%為 RT-PCR(+)NS1Ag(+）、19%為 RT-PCR(+)NS1Ag(-)、及

4. 屈公病的境外移入病患：台灣地區自 95 年初開始進行節肢動物媒介病毒監測至今，我們共檢驗出 20 例屈公病確定病例，其中 18 例是由機場入境發燒篩檢檢驗出，2 例是由醫院通報檢驗出。表五為 20 例患者及病毒之相關資料，包括患者入境時間及國家、病毒基因型及病毒株之來源，其中有 10 株病毒株由印尼引進，屬於印尼的亞洲基因型，其他 10 株病毒株分別由新加坡（2 株）、孟加拉（1 株）、馬來西亞（4 株）、印度（1 株）、與泰國（2 株）引進，屬於中/東/南 非洲基因型。圖二為所有 19 株病毒株 Partial E1 基因 1044 bp 之親源性分子樹圖，圖三為 9 株中/東/南 非洲基因型病毒株 Partial E1 基因 836 bp 之親源性分子樹圖。綜合結果顯示 95 年新加坡分離株與 97 年印度分離株為 E1-226(A)原型株，與某些 2006 年印度株(IND-06-AP3, IND-06-TN1 and DRDE-06)及 2008 年印度株及新加坡株（India/Kokkarayapalli/2008, and Singapore/EHIss622/2008）最相似；而 97 年孟加拉與馬來西亞分離株、及 98 年馬來西亞、新加坡與泰國分離株均為 E1-226(V)變異株，與 2007 年 India/ALP-6/2007, Italy/ITA07-RA1/2007 , SG(India)/2007/FJ445486 及 2008 年 Sri Lanka/2008/FJ445424, SG(Malaysia)/2008/FJ445479 最相似，此結果與最近文獻報導 Cameroon/Gabon/Reunion island (Indian Ocean Islands)/India

5. **屈公病毒與登革病毒共同感染的新加坡境外移入病患分析：**我們也發現2009年新加坡境外移入的屈公病患同時感染了第二型登革病毒。而他的弟弟在3天的新加坡旅遊期間也感染了相同的第二型登革病毒株。**圖四**為這2個兄弟分離出之登革病毒株之親源性分子樹圖，此結果顯示其 envelope gene 完全相同。因為只有哥哥共同感染了登革病毒與屈公病毒，而弟弟僅感染了登革病毒，我們推測可能是由不同的兩隻蚊子叮咬，分別帶有登革病毒與屈公病毒所致。此屈公病毒如上分析，為 E1-226(V)變異株；而此第二型登革病毒株屬於新加坡的第二型登革病毒株。
6. **屈公病毒與羅斯河病毒的血清學 (IgM and IgG ELISA) 檢驗：**我們運用以前建立 flavivirus 血清學檢驗系統經驗，利用 alphavirus 特異性單株抗體 (sc-58088, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 及病毒感染細胞產生的上清液做抗原，成功地建立了 alphavirus 的 capture IgM and IgG ELISA，可以檢驗各種 Alphavirus 的特異性 IgM、IgG 抗體。**圖五**為屈公病毒 (CHIKV) 與羅斯河病毒 (RRV) Capture IgM and IgG ELISA 結果，顯示感染屈公病毒的確定病例恢復期血清，對屈公病毒有強的 IgM 及 IgG 反應，但對羅斯河病毒則為陰性反應。而感染羅斯河病毒的確定病例恢復期血清，對羅斯河病毒有強的 IgM 及 IgG 反應，但對屈公病毒則為陰性反應。研檢中心自 98 年 7 月已開始對登革熱疑似病例進行屈公病檢驗 (包括分子檢驗及血清學檢驗)，昆陽實驗室目前已檢驗了 38 例通報屈公病及 301 例通報登革熱的血清檢體，

7. 利用機場發燒篩檢監測立克次體菌：近年來，立克次體菌 (*Rickettsia*) 的地方性流行與國際間傳播日益增加(1,2,30)，台灣地區也有境外移入的例子。我們曾報告 1 例台灣旅遊者在南非感染非洲蜱咬熱 (African Tick Bite Fever, ATBF) 的病例 (2006 年 4 月醫院報告) (31,32)。97 年，我們也自醫院通報病例中檢驗出境外移入恙蟲病 (印度) 及地方性斑傷寒 (泰國、新加坡) 陽性個案。今年我們試圖評估機場發燒篩檢對疑似發燒病患進行立克次體菌檢驗之效益。利用立克次體 16S rDNA，恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa type-specific antigen 及 groEL gene，斑疹傷寒及斑點熱 17 kDa gene 及 gene D 等之核酸序列設計出可偵測病人血液中立克次體之引子，再配合螢光定量 PCR 產物核酸定序。2 月 1 日-10 月 31 日共篩檢 2,201 件發燒病患，尚未檢驗出陽性病例，表 6 是其中 316 支檢體，知道來源國家的地區分佈情形，主要是東南亞國家。

討論

本計畫目標在建立一套病媒性傳染病之主動監測與實驗室診斷系統，在主動監測部分，強化機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選，以防止各種新興及再浮現傳染病的入侵。在實驗室診斷部分，建立完成一套病媒性傳染病的分子與血清學診斷系統，有效的檢驗重要的節肢動物媒介病毒與立克次體菌感染。

為有效監測急性期病菌感染，我們建立了多重病毒/立克次體菌單步驟 SYBR 螢光 Real-time RT – PCR 或 PCR 檢驗方法，利用三套混合引子，包括黃病毒、登革病毒、阿爾法病毒特異性引子去篩選節肢動物媒介病毒，及利用二套混合引子，包括立克次體 16S rDNA/恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa type-specific antigen 及斑疹傷寒/斑點熱 17 kDa gene/gene D 之引子去篩選立克次體菌，若檢驗為陽性反應者，再經過各病菌特異性引子及基因序列分析確認，陽性檢體則進行病菌分離。

目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的監測系統之一，能有效降低傳染病的引進。於民國 92-97 年分別檢驗出登革熱確定病例 17、57、46、48、75 及 102 人，約佔全部境外移入病例之 45%。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原菌的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區、及檢驗實驗室的效能有關。自 2006 年初開始擴大進行節肢動物媒介病毒監測，我們共檢驗出 19 例屈公病確定病例，並於 2006 年 11 月首次發現新加坡境外移入屈公病例。新加坡政府自 2008 年開始建立監測計畫，2008 年與 2009 年均有 >300 例屈公病確定病例，其中境外移入約有 50 例。

由於 97 年於機場發燒篩檢評估使用登革熱 NS1 抗原快篩檢驗試劑之結果良好，我們已於 98 年度正式將登革熱 NS1 抗原快速檢驗試劑

使用於機場發燒篩檢及醫院通報疑似登革熱病患之檢驗。確定病例 (RT-PCR(+) 或 NS1Ag(+)) 的急性期/早恢復期血清 (1-10 天) 結果分析, 分別為 19% RT-PCR(+)NS1Ag(-) 及 20% RT-PCR(-)NS1Ag(+), 顯示 RT-PCR 檢驗 (1-7 天血清) 及 NS1 抗原快篩檢驗 (1-10 天血清) 都會遺漏部分陽性檢體, 在登革熱急性期/早恢復期血清快速檢驗上均十分重要, 也有助於緊急防治工作。由於現有快速檢驗試劑之靈敏度在檢測二次感染與第二型登革病毒感染之靈敏度較低, 極需改進, 及未來大量使用時之成本考量, 建議台灣應自行開發第二代快速檢驗試劑, 提升靈敏度, 有助於病患之治療與防治工作。

由於源自於印度的中/東/南 非洲基因型印度原型株 E1-226(A) 及其 E1-226(V) 變異株目前已傳播至印度各地、新加坡、馬來西亞、泰國、與越南等地造成本土流行。又 E1-226(V) 變異株, 可有效地透過白線斑蚊傳播, 未來很可能傳播到許多亞洲國家, 導致登革熱和屈公病之共同流行。事實上, 上述國家目前都已經成為登革熱、日本腦炎、及屈公病共同流行地區。在台灣, 由於白線斑蚊分佈在全島範圍, 而埃及斑蚊只分佈在台灣南部, 因此也有登革熱、日本腦炎、及屈公病共同流行之風險, 尤其是在台灣南部。

在評估機場發燒篩檢對疑似發燒病患進行立克次體菌分子檢驗方面, 我們共篩檢了 2,201 件發燒病患, 尚未檢驗出陽性病例。立克次體菌感染之血液菌體量濃度較低, PCR 分子檢驗方法需要很高的靈敏度與特異性, 技術上可能較節肢動物媒介病毒困難, 此部分需要再檢討改進。機場發燒篩檢之血液檢體收集方面, 謝謝二分局同仁的協助, 協助此評估計畫順利進行。

結論與建議

在全球經濟一體化趨勢下，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重，由於全球溫室效應影響，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的病媒性傳染病監測、快速檢驗與流行病學分析系統，能監測台灣地區已知存在（登革病毒及日本腦炎病毒）及未來可能會侵入的病媒性傳染病是十分重要的。我們的研究顯示機場發燒篩檢是一種有效的監測系統，若能在機場使用登革熱快速檢驗試劑，可及時發現境外移入的確定病例，進行緊急防治工作，有效防止病原菌的本土擴散。登革熱確定病例(RT-PCR(+) 或 NS1Ag(+))的急性期/早恢復期血清(1-10 天)結果分析，顯示 RT-PCR 檢驗（1-7 天血清）及 NS1 抗原快篩檢驗（1-10 天血清）都會遺漏部分陽性檢體，在登革熱急性期/早恢復期血清快速檢驗上均十分重要。由於現有快速檢驗試劑之靈敏度在檢測二次感染與第二型登革病毒感染之靈敏度較低，極需改進，及未來大量使用時之成本考量，建議台灣應自行開發第二代快速檢驗試劑，提升靈敏度，有助於病患之治療與防治工作。我們的研究結果也顯示各種登革病毒、E1-226A 與 E1-226V 中/東/南 非洲基因型印度株、及亞洲基因型印尼株屈公病毒已在印度及東南亞地區擴散。目前，包括印度各地、印尼、新加坡、馬來西亞、泰國、與越南等地都已經成為登革熱、日本腦炎、及屈公病共同流行地區。未來，極有可能在台灣，尤其是在南部地區，造成登革熱、日本腦炎、與屈公病共同流行，成為公共衛生防疫上的重大問題，應積極加強監測。在評估機場發燒篩檢對疑似發燒病患進行立克次體菌分子檢驗方面，並未檢驗出陽性病例，似乎顯示立克次體菌之機場發燒篩檢效果不如預期，並非有效的監測方法。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

我們的研究顯示機場發燒篩檢是一種有效的監測系統，能在登革熱和屈公病病人還在病毒血症時被篩檢出，進行必要的緊急防治工作，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。若能在機場使用登革熱快速檢驗試劑，更可及時確認登革熱病患，提醒其儘快就醫，可避免執行緊急噴藥等防治工作。

在評估機場發燒篩檢對疑似發燒病患進行立克次體菌分子檢驗方面，並未檢驗出陽性病例，顯示立克次體菌之機場發燒篩檢效果不如預期，並非有效的監測方法。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、實施病人自主管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的監測與通報系統配合。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

登革熱確定病例（RT-PCR(+) 或 NS1Ag(+)）的急性期/早恢復期血清（1-10 天）結果分析，顯示 RT-PCR 檢驗（1-7 天血清）及 NS1 抗原快篩檢驗（1-10 天血清）都會遺漏部分陽性檢體，在登革熱急性期/早恢復期血清快速檢驗上十分重要。

由於現有快速檢驗試劑之靈敏度在檢測二次感染與第二型登革病毒感染之靈敏度較低，極需改進，及未來大量使用時之成本考量，建議台灣應自行開發第二代快速檢驗試劑，提升靈敏度，有助於患者之早期診斷與治療、疫情之監測與緊急防治工作。

由於各種登革病毒、E1-226A 與 E1-226V 中/東/南 非洲基因型印度株、及亞洲基因型印尼株屈公病毒已在印度及東南亞地區擴散。未來，登革熱、日本腦炎、及屈公病有可能在台灣，尤其是在南部地區共同流行，成為公共衛生防疫上的重大問題，應積極加強監測。

參考文獻

1. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, von Sonnenburg F, Schwartz E; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 15;44(12):1560-8. Epub 2007 May 7.
2. Wilson ME, Freedman DO. Etiology of travel-related fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Oct;20(5):449-53. Review.
3. Ole Wichmann, Annekathrin Lauschke, Christina Frank, Pei-Yun Shu, Matthias Niedrig, Jyh-Hsiung Huang, Klaus Stark, Tomas Jelinek. 2005. Dengue antibody prevalence in German travelers. *Emerg Infect Dis.* 11:762-765.
4. Bessaud M, Peyrefitte CN, Pastorino BA, Tock F, Merle O, Colpart JJ, et al. Chikungunya virus strains, Reunion Island outbreak. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1604-6.
5. Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB, Gandhe SS, et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1580-3.
6. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.* 2007; 88: 2363-77.

7. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:319-27.
8. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:460-2.
9. Shu PY, Yang CF, Su CL, Chen CY, Chang SF, Tsai KH, Cheng CH, Huang JH. Two imported chikungunya cases, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1326-7.
10. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, Lin CC, Shu PY. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1854-6.
11. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, et al. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: A molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:903-909.
12. 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. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80:1039-1046.

13. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:852-4.
14. Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB, Gandhe SS, et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1580-3.
15. Manimunda SP, Singh SS, Sugunan AP, Singh O, Roy S, Shriram AN, et al. Chikungunya fever, Andaman and Nicobar Islands, India. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1259-60.
16. Leo YS, Chow AL, Tan LK, Lye DC, Lin L, Ng LC. Chikungunya outbreak, Singapore, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:836-7.
17. Ng LC, Tan LK, Tan CH, Tan SS, Hapuarachchi HC, Pok KY, Lai YL, Lam-Phua SG, Bucht G, Lin RT, Leo YS, Tan BH, Han HK, S Ooi PL, James L, Khoo SP. Entomologic and virologic investigation of Chikungunya, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1243-9.
18. O. Noridah, V. Paranthaman, S.K. Nayar, M. Masliza, K. Ranjit and I. Norizah et al., Outbreak of chikungunya due to virus of Central/East African genotype in Malaysia, *Med J Malaysia* 62 (2007), pp. 323–328.

19. Sam IC, Chan YF, Chan SY, Loong SK, Chin HK, Hooi PS, Ganeswrie R, Abubakar S. Chikungunya virus of Asian and Central/East African genotypes in Malaysia. *J Clin Virol.* 2009; 46:180-3.
20. Apiradee Theamboonlers, Pornpimol Rianthavorn, Kesmanee Praianantathavorn, Norra Wuttirattanakowit¹, and Yong Poovorawan. Clinical and Molecular Characterization of Chikungunya Virus in South Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009; 62, 303-305.
21. Wu JW, Lee TC, Huang TM, Chen CH. The first case of chikungunya fever in Taiwan. *Taiwan Epidemio Bull.* 2007;23:130-6.
22. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2408-16.
23. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1295-304
24. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;4:387–391.

25. Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of 2 commercially available dengue NS1 capture enzyme-linked immunosorbant assays for diagnosis of acute DENV infection with a single clinical sample. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:140-8.
26. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e280.
27. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:622-30.
28. Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:642-50.
29. Pei-Yun Shu, Cheng-Fen Yang, Jeng-Fong Kao, Chien-Ling Su, Shu-Fen Chang, Chien-Chou Lin, Wen-Chih Yang, Hsiu Shih, Shih-Yan Yang, Ping-Fuai Wu, Ho-Sheng Wu, and Jyh-Hsiung Huang. 2009. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:589-591.

30. Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Perspect.* 2001 109 Suppl 2:223-33.
31. Tsai YS, Wu YH, Kao PT, and Lin YC. 2008. African tick bite fever. *J Formos Med Assoc.* 107:73-76.
32. Kun-Hsien Tsai, Hsiu-Ying Lu, Jyh-Hsiung Huang, Pierre-Edouard Fournier, Oleg Mediannikov, Didier Raoult, and Pei-Yun Shu. 2009. African Tick-Bite Fever in a Taiwanese Traveler Returning from South Africa: Molecular and Serological Studies. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 81:735-739.
33. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods.* 2005;124:65-71.
34. Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3:e263.
35. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley

Table 1. Primer sets used for real-time RT-PCR screening of arbovirus

Primer name	sequence(5'→3')	Region	amplicon size
Alphavirus			
AL-2	TAA TGC CAG AGC GTT TTC GCA	NS1	414 b.p.
AL-3	GTG GTG TCA AAC CCT ATC CA		
NS1-96F	GCA GGT CAC DCC DAA TGA CCA TGC	NS1	442 b.p.
NS1-538R	ACA TGA ADG GGG TTG TGT CGA A		
NS4-1125F	TGG AAA CGG ACA TNG CNT CNT TTG A	NS4	281 b.p.
NS4-1406R	ATG TTG TCG TCG CCG ATG AAV GC		
Chikungunya Virus			
CHIKV-F	AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G	E1	209 b.p.
CHIKV-R	CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT		
Ross River Virus			
RRV1	GGG TAG AGA GAA GTT YGT GGT YAG	E2	120 bp
RRV2	CGG TAT ATC TGG YGG TGT RTG C		
Flavivirus			
FL-F162	GGC ATA TGG TAC ATG TGG CTA GGA GC	NS5	153 b.p.
FL-R3	GTG ATT CTT GTG TCC CAT CCG GCT GTG TCA TC		
FL-R163	GTA ATG CGG GTG TCC CAG CCA GCT GTG TCA TCA TC		
1370F	TGY GTB TAC AAC ATG ATG GG	NS5	250 B.P.
1620R	GTG TCC CAN CCH GCT GTG TCA		
Dengue Virus			
R36	CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA	C	200 b.p.
R169	CCC CAT CTA ACC AAT ATT CCT GCT		
R170	CCC CAT CTG TTC AGT ATC CCT GCT		
Japanese Encephalitis Virus			
R145	GW (A/T)A AGC CCT CAG AAC CGT CTC GGA A	3UTR	215 b.p.
R146	CR (G/A)C GGG GTC TCC TCT AAC CTC TAG TCC		
10F	CTG GGA ATG GGC AAT CGT G	E	315 b.p.
325R	TGT CAA TGC TTC CCT TCC C		
West Nile Virus			
WN9483	CAC CTA CGC CCT AAA CAC TTT CAC C	NS5	311b.p.
WN9794	GGA ACC TGC TGC CAA TCA TAC CAT C		
Yellow Fever Virus			
YF-F	GTC AAT ATG GTA CGA CGA GGA G	C	135b.p
YF-R	AGT CAA AAT GTT GAA CAA AAA GAA A		

Table 2、立克次體 SYBR Green 螢光定量 PCR 所使用之引子

Primer	Nucleotide sequence	Gene	Specificity
RST-14F	CCA TTT GGT GGT ACA TTA GCT GCA GGT	<i>Tsa 56</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-6R	TCA CGA TCA GCT ATA CTT ATA GGC A	<i>Tsa 56</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-25F	CTT TGC AAC GAA TCG TGA AAA GAT GAT TAC	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RST-26R	GTA AGA GCT TCT CCG TCT ACA TCA TCA GCA	<i>GroEL</i>	<i>O. tsutsugamushi</i>
RR-F1	AAA ATG GTT GCT GAG CTT GAA AAT CCT TT	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R2	ACT TTC AAA CCA CCA CGT AAT CTA TTG AC	<i>GroEL</i>	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-F8	GGC GGY GCA TTA CTT GGT TCT CAA TTC GG	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
RR-R12	GTT TTC CSC CTA TTA CAA CTG TTT GAG T	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
17kDaF2	GCA TTA CTT GGT TCT CAA TTC GG	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
17kDaR1	CGC CAT TCT ACG TTA CTA CCR C	17-kD	Rickettsia group (TG, SFG)
geneDF1	ACT GCC CAC TAC GAA GAA GGA CCA	Gene D	Rickettsia group (TG, SFG)
geneDR1	ACG CTC TGY CCT TGG TTT AGT TCT	Gene D	Rickettsia group (TG, SFG)
16sRNAOTF7	CCA GYG GGT RAT GCC GGG AAC TAT	16S rDNA	STG, TG, SFG
16sRNAOTR6	GGC AGT GTG TAC AAG GCC CGA GAA	16S rDNA	STG, TG, SFG

Table 3. Countries of origin of imported dengue cases and dengue virus serotypes in 2009, Taiwan (2009/1/1 to 2009/11/30)

Country	Case	Fever screening	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4	SubTotal
Indonesia (ID)	69	44	8	12	10	10	40
Vietnam (VN)	59	29	31	7	4	1	43
Thailand (TH)	18	9	8	2	1		11
Philippines (PH)	16	10	1	6	4	1	12
Cambodia (KH)	8	4		7			7
Myanmar (MM)	5	2			1		1
Singapore (SG)	2	0		2			2
Pakistan (PK)	2	2				1	1
Malaysia (MY)	3	3	2		1		3
India (IN)	6	3		2			2
Bangladesh (BD)	1	1			1		1
Unknown	1	0					0
Total	190	107	50	38	22	13	123

Table 4. Identification of positive dengue cases by RT-PCR, and/or NS1 Ag rapid test, 200806-200910.

Test	Positive case	% positive
PCR+NS1+	122	61%
PCR+NS1-	38	19%
PCR-NS1+IgM/IgG+ (1-7days^a)	22	11%
PCR-NS1+IgM/IgG+ (8-10days)	15	7.5%
PCR-NS1+IgM/IgG-	3	1.5%
Total (confirmed)	200	(days 1-10)

a: after onset of illness.

Table 5. Imported chikungunya in Taiwan, 2006-2009.

CK9500004	2006	0611aTw	Singapore	A	ECS African ^b
CK9600005	2007	0706aTw	Indonesia	A	Asian
CK9600009	2007	0712aTw	Indonesia	A	Asian
CK9600010	2007	0712bTw	Indonesia	A	Asian
CK9700003	2008	0802aTw	Indonesia	A	Asian
CK9700008	2008	0804aTw	Indonesia	A	Asian
CK9700013	2008	0806aTw	Indonesia	A	Asian
CK9700029	2008	0810aTw	Bangladesh	V	ECS African
CK9700030	2008	0810bTw	Malaysia	V	ECS African
CK9700032	2008	0811aTw	Indonesia	A	Asian
CK9700033	2008	0812aTw	Malaysia	V	ECS African
CK9700034	2008	0812bTw	Malaysia	V	ECS African
CK9700035	2008	0812cTw	India	A	ECS African
CK9800001	2009	0901aTw	Malaysia	V	ECS African
CK9800002	2009	0904aTw	Singapore	V	ECS African
CK9800003	2009	0904bTw	Indonesia	A	Asian
CK9800009	2009	0905aTw	Thailand	V	ECS African
CK9800020	2009	0908aTw	Indonesia	A	Asian
CK9800028	2009	0909aTw	Indonesia	A	Asian
CK9800030	2009	0911aTw	Thailand	V	ECS African

a: E1-226: A is Alanine and V is Valine in E1 residue 226.

b: ECS African genotype: Eastern/Central/South African genotype.

Table 6. Known geographic distribution of some patients of fever screening at airports tested for Rickettsia infection in Taiwan, 2009

來自地區	個案數
大陸	34
印尼	63
柬埔寨	13
香港	8
泰國	63
寮國	1
印度	2
帛琉	2
馬來西亞	48
菲律賓	20
越南	48
新加坡	12
緬甸	1
澳洲	1
西班牙	1
總計	316

DEN RT-PCR檢驗件數及陽性數統計

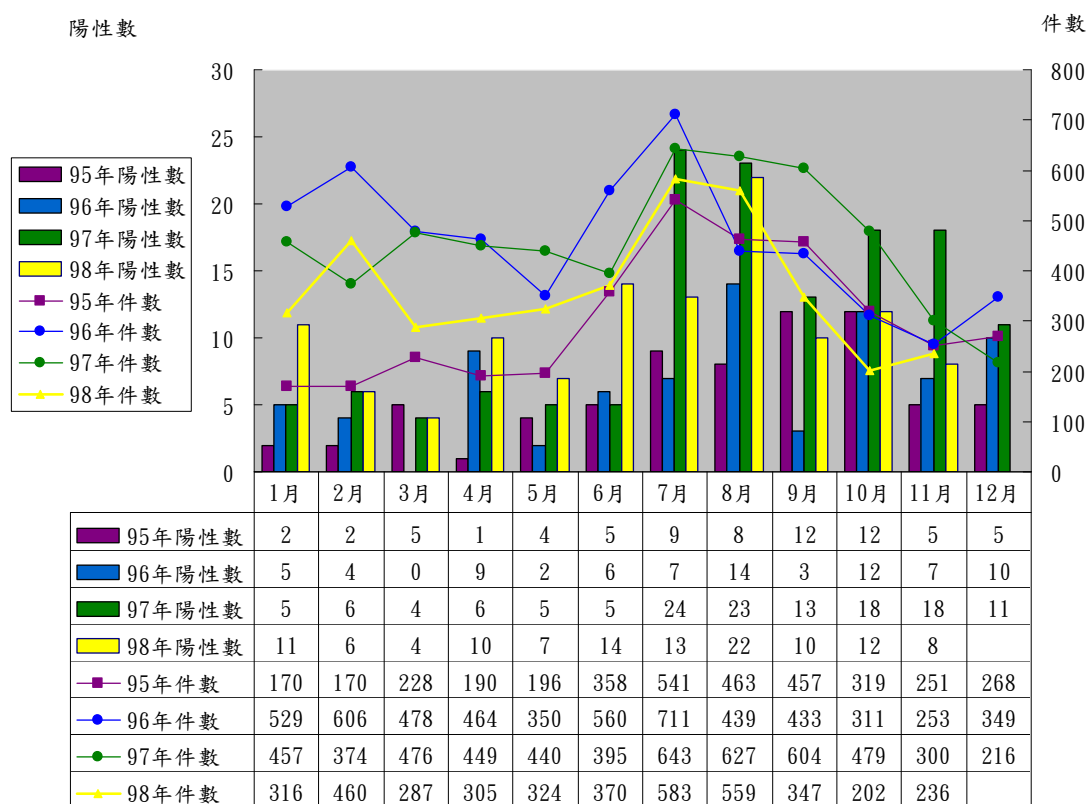


Figure 1. The monthly distribution and annual trends of imported dengue cases identified at Taoyuan international airport during 2006-2009. Acute-phase serum samples of fever patients identified by fever screening active surveillance at Taoyuan International Airport were tested for dengue virus infection. The total reported cases and Rt-PCR positive confirmed dengue cases were presented. The peak period is from July to October.

Phylogenetic tree of partial E1 gene (1044bp) of CHIKV

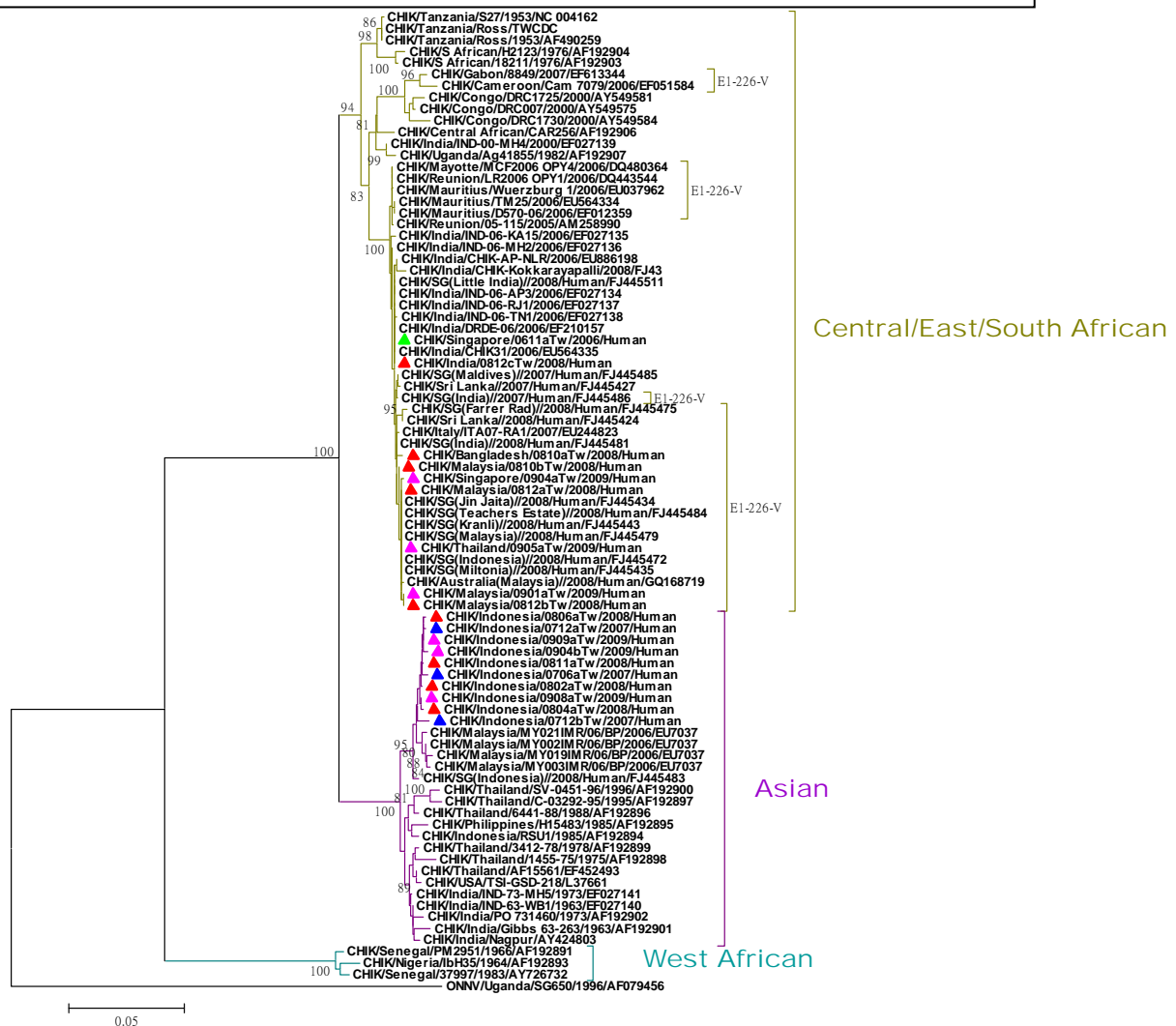


Figure 2. Phylogenetic relationships of chikungunya virus (CHIKV) isolates from the 19 imported cases in Taiwan. The tree was constructed by the neighbor-joining method using partial nucleotide sequences of envelope protein 1 (E1) gene (1044 bp) of 56 CHIKV strains. The 19 imported CHIKV strains in Taiwan are designated by color marks. Viruses were identified using the nomenclature of virus/country/strain/year of isolation/GenBank accession number. The scale bar on the left indicates substitutions per site.

Phylogenetic tree of partial E1 gene (836bp) of CHIKV



Figure 3. Phylogenetic relationships of chikungunya virus (CHIKV) isolates of Central/East/South African genotype from the 9 imported cases in Taiwan. The tree was constructed by the neighbor-joining method using partial nucleotide sequences of envelope protein 1 (E1) gene (836 bp) of 65 CHIKV strains. The 9 imported CHIKV strains in Taiwan are designated by color marks. Viruses were identified using the nomenclature of virus/country/strain/year of isolation/GenBank accession number. The scale bar on the left indicates substitutions per site.

Phylogenetic tree of partial E gene (534 bp) in DENV-2

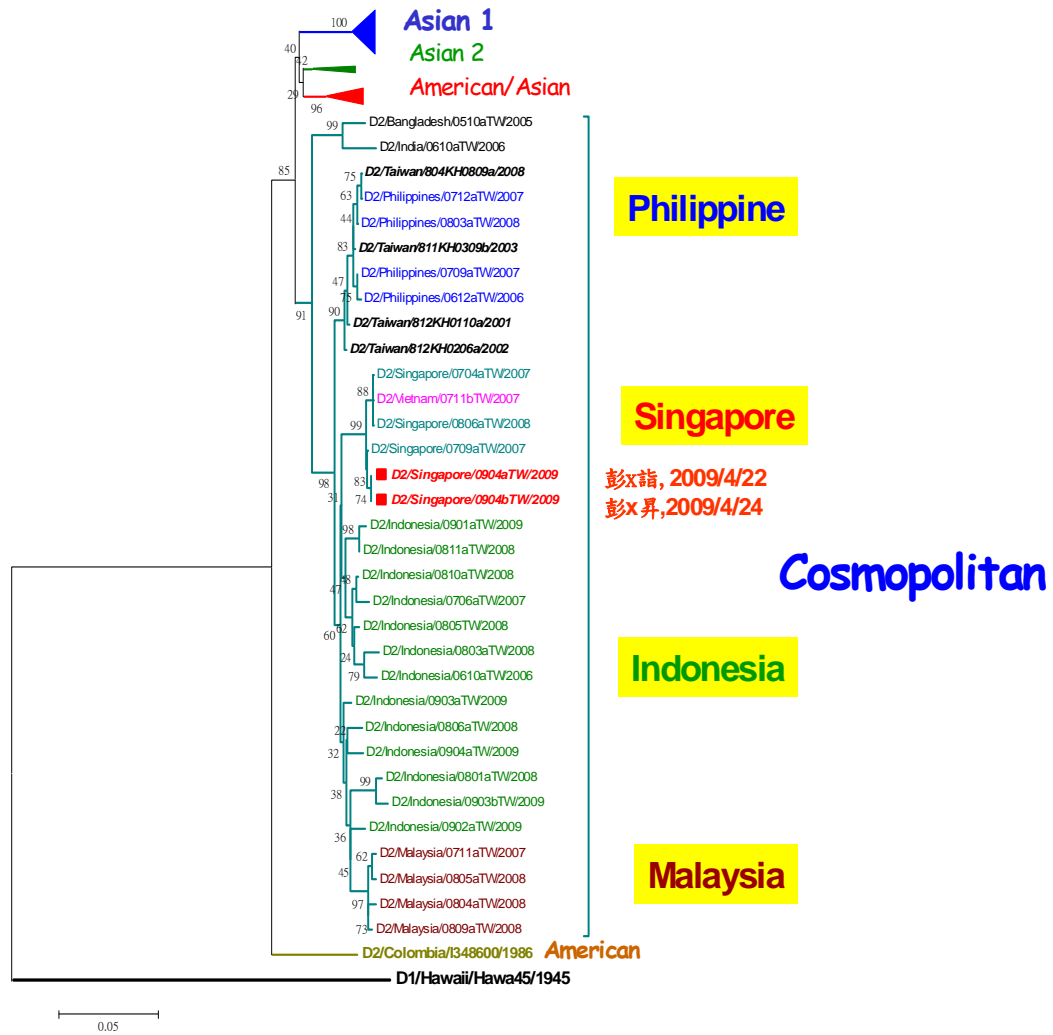


Figure 4. Phylogenetic analysis of two dengue virus (DENV-2) strains isolated from two brothers returning from Singapore, Apr. 2009. The brother was co-infected with DENV-2 and chikungunya virus (E1-226V) and the younger brother was infected with the same DENV-2 strain clustered with Singapore strains.

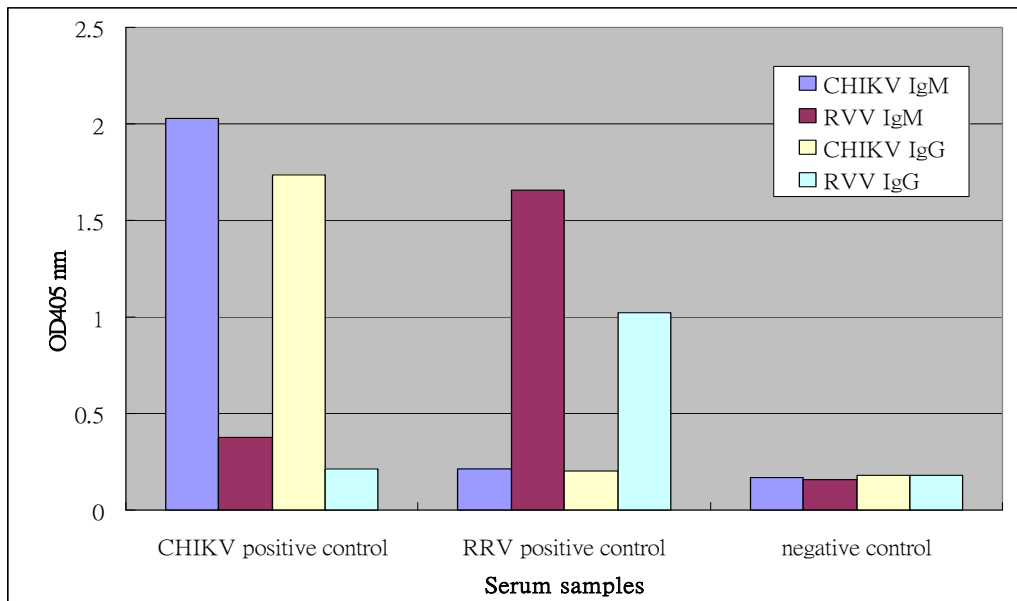


Figure 5. Capture IgM and IgG ELISA of Chikungunya Virus (CHIKV) and Ross River Virus (RRV).