

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000101

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

台灣登革病毒及其他病媒病毒之監測與特性分析

年度研究報告

執行單位：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、林世滋、張梅君、張淑芬

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

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	(11-13)
(4) 討論	(14-17)
(5) 結論與建議	(18-19)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(20)
(7) 參考文獻	(21-22)
表次	(23)
圖次	(24-33)
	共 (33) 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)。2015 年登革熱在南台灣發生二次大戰以後，台灣史上規模最大的流行。截至 2015/11/9 止，台南市登革熱病例已達 22,099 例，高雄市病例 8,495 例，屏東縣病例 170 例，其他縣市 390 例，全台灣共 31,154 例登革熱本土病例。由分子流行病學及病毒基因親緣分析顯示，高雄市 1-6 月流行的病毒主要是延續去年造成大流行之第一型登革病毒株 (DENV-1)，7 月以後，除了 DENV-1 流行外，在台南市流行的第二型登革病毒株(DENV-2)也漸漸在高雄市傳播及流行。在 8 月時，DENV-2 已成為高雄市主要的流行病毒。台南市在 5 月初開始進入登革熱流行季，9 月病例數到達高峰，10 月以後病例數下降。主要流行 DENV-2，病毒為境外引入，可能的來源國家為印尼。其他縣市包括屏東縣、新北市及台北市的病例主要是在台南市或高雄市感染。此外，也發現其他 3 株 DENV-2，來源均為印尼，分別在高雄市及屏東縣造成散發流行。另也發現一株 DENV-3，感染的病例居住於屏東縣，病毒來源為新加坡。截至 2015/11/9 止，共有 289 個境外移入病例，來源國家以印尼最多(78 例)，其次為馬來西亞(42 例)、菲律賓(40 例)及越南(34 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，分離出之 29 株日本腦炎病毒株全部屬於第一基因型病毒。

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 fever and Japanese encephalitis are the most important vector-borne viral diseases in Taiwan. In 2015, the most severe dengue outbreak has occurred in southern Taiwan. Up to 2015/11/9, a total of 31,154 indigenous dengue cases have been identified. There were 22,099 dengue cases in Tainan City, 8,495 cases in Kaohsiung City, and 170 cases in Pingtung County. In Kaohsiung City, an epidemic DENV-1 strain which caused outbreak in 2014 was continuously transmitting in the city during January-June, 2015. In July, an additional DENV-2 strain which caused severe outbreak in Tainan City was introduced to and co-circulated with DENV-1 in Kaohsiung City. In August, the DENV-2 strain has become the predominant epidemic strain and caused large outbreak in Kaohsiung City. In Tainan City, the epidemic DENV-2 strain was first identified in North District in May, and then spread throughout the city. The number of dengue cases peaked in September (12,816 cases) and then declined (4,815 cases in October). This epidemic DENV-2 strain was likely introduced from Indonesia. Up to 2015/11/9, a total of 289 imported dengue cases were identified, travelers were arriving from 16 countries. Indonesia (78 cases), Malaysia (42 cases), the Philippines (40 cases) and Vietnam (34 cases) were the most frequent importing countries.

Japanese encephalitis (JE) is widespread in Asia and is an endemic disease in Taiwan. Our surveillance data in mosquitoes showed that all of the JEV strains (29 strains) identified in 2015 belonged to genotype I of JEV.

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、馬來西亞、菲律賓、越南及泰國等國，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 2015 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)。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. **2015 年台灣地區登革熱本土流行之分析結果**：高雄市在 2015 年 1-6 月間，有 163 例本土登革熱病例，主要是延續去年 DENV-1 的流行。從 7 月開始登革熱進入流行季節，除了原流行之 DENV-1 外，台南市流行之 DENV-2 病毒株也開始在高雄市傳播開來，至 9 月時高雄病例數急遽增加，DENV-2 已成為主要流行的病毒，截至 2015/11/9 止病例數已達 9,302 例，以三民區 2,535 病例數最多，其次苓雅區 1,039 例、前鎮區 1,039 例、鳳山區 840 例。台南市在 5 月發現一 DENV-2 病毒流行株(首例發病日 2015/5/16)，登革熱病例數由 5 月的 4 例確定病例到 6 月的 20 例，7 月 298 例、迅速攀升至 8 月 3,949 例、9 月時到達流行高峰，病例數高達 12,816 例、10 月後開始疫情趨緩，病例數下降至 4,815 例。截至 2015/11/9 止，台南市登革熱病例數已達 22,196 例，以北區 5,671 病例數最多，其次中西區 3,472 例、南區 3,433 例、東區 2,975 例。其他縣市的病例主要是在台南市及高雄市感染，包括屏東縣 185 例、新北市 71 例及台北市 68 例等。至 2015/11/9 止，全國共有 31,995 登革熱本土病例、496 例登革熱重症病例，其中有 141 例死亡，是台灣自二次大戰以來最大規模的登革熱流行。台南市流行的病毒株為 DENV-2 (Figure 2，DENV-2-2)，其 E gene 核酸序列與 2015 年一印尼境外移入 DENV-2 序列相同，屬於 cosmopolitan genotype。高雄市除了 DENV-1 的流行為去年疫情之延續外，台南市 DENV-2 也傳播至高雄，在 8 月時取代 DENV-1 成為高雄市主要的流行病毒株。此外在一些散發病例中，我們分離到其他的病毒，包括在高雄市鳳山區一登革熱散發病例檢體中分離出一 DENV-2 病毒株(Figure 2，DENV-2-1)，核酸序列比對，推測來源為印尼。另外在高雄市左營區也發現一散發病例檢體中分離出一 DENV-2 病毒株 (Figure 2，DENV-2-3)，推測來源亦為印尼。另外在屏東縣一病人檢體

中分離出一 DENV-2 病毒株(Figure 2, DENV-2-4), 推測來源亦為印尼。在屏東縣一病人檢體中分離出一 DENV-3 病毒株(Figure 2, DENV-3), 推測來源為新加坡(Figure 2, 3, 4)。

2. **2015 年 1 月至 10 月 27 日止, 台灣共有 275 例境外移入登革熱確定病例。**表一為境外移入登革熱確定病例數及感染國別。主要的感染國家依次為印尼、馬來西亞、菲律賓及越南, 其中 109 例(39.6%)是由機場篩檢出來。境外移入病毒以 DENV-1 及 DENV-2 最多、其次為 DENV-3, 最少為 DENV-4。DENV-1 之境外移入病毒中, 以 genotype I (GI) 病毒株為主, 印尼、馬來西亞、越南及緬甸病毒株皆屬於 GI, 菲律賓病毒株則屬於 GII (Figure 5)。DENV-2 境外移入病毒中, 以 cosmopolitan genotype 為主, 印尼、馬來西亞、菲律賓、印度及馬爾地夫均屬於 cosmopolitan genotype, 越南、緬甸、泰國及柬埔寨則屬於 Asian 1 genotype, 其他基因型如 Asian 2 genotype 及 Asian/American genotype 則未偵測到 (Figure 6)。DENV-3 境外移入病毒中, 印尼及菲律賓病毒屬於 GI, 馬來西亞、泰國及新加坡病毒屬於 GIII, 與去年比較, 今年 GIII 病毒較多 (Figure 7)。DENV-4 境外移入病毒中, 與往年無變化, 越南及緬甸病毒屬於 GI, 印尼及菲律賓病毒屬於 GII (Figure 8)。由此可見, 東南亞流行的病毒仍以 DENV-1 的 genotype I 及 DENV-2 的 cosmopolitan genotype 為主 (表二), 近年來台灣流行的登革熱病毒血清型及基因型亦以這兩型為主。
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 13,136 隻病媒蚊, 分為 326 池 (pool), 以 RT-PCR 篩選 JEV 陽性檢體, 並進行日本腦炎病毒分離(Figure 9)。共有 72 池為 JEV 陽性, 分離出 58 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 5.5 (MIR=0.55%)。Figure 10

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，2015 年間所分離到的日本腦炎病毒株屬於 Genotype I (GI)。台灣日本腦炎病毒之 GI 可分為二個族群 (Cluster)；Cluster 1 包括 2015 年從花蓮，台中及台南採集到之病媒蚊體內分離到的 JEV。Cluster2 包括 2015 年從台北，宜蘭，花蓮，台中及台南採集到之病媒蚊體內分離到的 JEV。台灣的 JEV 與中國大陸、越南、日本的日本腦炎病毒的親緣關係最接近。

討論

本研究主要檢體來源為機場發燒篩檢、台灣中部及北部醫師通報檢體及南部地區部分採樣檢體。故對境外引進、全國的本土登革病毒來源、種類、血清型別及傳播方式均提供給防疫人員，協助疫情調查及防治工作。2015 年截至 11 月 9 日為止，全國共有 31,995 登革熱本土病例、496 例登革熱重症病例，其中有 141 例死亡，是台灣自二次大戰以後，規模最大的登革熱流行。在 1-6 月間，高雄市仍延續去年的 DENV-1 流行，雖然流行未曾間斷，但每月的病例數仍維持在 40 例以下。但自 7 月以後，台南市流行的 DENV-2 病毒也傳播至高雄市，很快地在人口稠密的三民、苓雅、前鎮、鳳山等區造成大流行，病例數也急遽上升。台南市則是在 5 月偵測到一 DENV-2 病毒株在北區流行，此病毒與 2015 年 4 月一位印尼境外移入病例分離出之 DENV-2 E gene 序列完全相同。6-7 月時 DENV-2 已漸漸擴散至台南市安南、東、永康及其他行政區，到 8-9 月時已在人口密集的北、中西、南及東區造成大流行。2014-2015 年連續兩年的南台灣登革熱大流行，造成許多重症及死亡，其原因是值得深思的。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。登革熱的主動監測，包括機場發燒篩檢、確定病例擴大疫調及接觸者採檢是有效的預防登革病毒傳播的方法。機場發燒篩檢所偵測到的病例絕大多數是處於病毒血症期，病人檢體採檢後實驗室可在 24-48 小時內發出報告，實施適當的防疫措施。而確定病例的擴大疫調及接觸者採檢則可檢驗出無症狀、未就醫及未通報

的登革熱病例，在疫情剛開始時(第一波)，由於病毒在蚊子繁殖約需 8-10 天才具有傳播能力，若能即時調查出指標病例及病毒來源，實施緊急防治措施，則可適時的阻斷人-蚊-人的傳播循環。故在流行季開始時，實施完整的主動監測，發現無症狀感染者、未就醫及未通報的登革熱病例，並有效降低病媒蚊密度，應可有效的阻斷病毒的傳播循環，預防疫情的擴大。在流行期間，除了病媒蚊的控制外，也應實施完整的主動監測及檢驗，減少病人將病毒傳給病媒蚊，阻斷人-蚊-人的傳播循環，避免疫情的擴大。主動監測實施時，同時做衛教宣導及清除孳生源。

傳染病之防治首重預防，但因目前仍無登革疫苗，故防治的策略在於阻斷人-蚊-人間的病毒傳播循環。主動監測如機場發燒篩檢可減少境外病毒之引進及傳播。另外如確定病例之主動調查，可由實驗室診斷包括病毒核酸、抗原及抗體檢測，找出指標病例、無症狀感染者、未就醫的病人及醫師未通報之病人等。因為人是病毒的 amplifying host 及傳播者，如能及時發現受感染者的地理分布範圍，實施有效的化學防治清除帶病毒的成蚊，並徹底清除孳生源，則能阻斷人-蚊-人的傳播循環。病媒的防治需要社區的配合，故社區動員徹底清除孳生源及衛教宣導是否成功，是病媒防治成功與否的關鍵。台灣的生態環境極適合病媒蚊的孳生，除 1-3 月病媒蚊密度較低外，其他月份均適合病媒蚊生長，對於防疫是艱難的挑戰。應發展合適的獎懲制度，使人們樂於主動通報登革熱及清除孳生源等。因為一旦病毒擴散開來，需要大量的資源及人力用於防治及醫療。此外，對環境無害的生物防治方法應多加利用及開發，減少疫病對人們的威脅。

今年登革熱流行的特徵為：(1) 高雄市及台南市均發生登革熱大流行；(2) 高雄市在 1-6 月時，延續去年 DENV-1 的流行，但自七月

以後，DENV-2 也開始流行，由於多數市民對 DENV-2 無免疫力，故疫情不斷擴大；(3) 台南市自 5 月發現 DENV-2 後，無法有效遏阻病毒的傳播，至 8-9 月病例數已超過 15,000 例，高居歷年之冠。(4) 截至 2015/11/9 止，共有 289 例境外移入病例，較往年為高。境外移入病例以印尼最多、馬來西亞次之、其次為菲律賓及越南。近年來本土流行的主要病毒株也多來自印尼及馬來西亞。

地方性傳染病是指病毒已存在於環境中，不需由外界引進，即可造成本土流行。由 JEV 親緣性分析顯示，近年來除了原有的 JEV GIII 外，引進之 JEV GI 亦進行本土性演化。顯示台灣的生態環境適合 JEV 存在及演化。每年春天，病媒蚊密度增加後，即開始日本腦炎的流行。台灣在 2008 年以前，所有文獻記載的 JEV strains 皆屬於 genotype III，2008 年首次在台北市關渡自然公園及宜蘭縣五結鄉發現 JEV genotype I。因為關渡及五結鄉兩地皆接近於候鳥棲息的濕地，故推測病毒藉由候鳥境外引入，逐漸取代台灣原有之 GIII。2009 年以後陸續在中部及南部發現 GI，至 2010 年，GI 已成為台灣最主要的 JEV 基因型。從 JEV 演化親緣分析發現，JEV GI 為多次引進，且在台灣本土進行演化。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。台灣地區 2008 以前的病毒屬於 GIII。2008 年間，首度在台灣北部發現 GI 日本腦炎病毒株。JEV GI 病毒在 2009-2012 年間快速取代 GIII。2015 年台灣北、中、南及東部的日本腦炎病毒株皆屬於 GI。

近年來，日本腦炎病毒雖由 GIII 基因型轉變為 GI，但每年日本腦炎病例數仍維持在 40 例以下，故目前使用的 JEV 疫苗，仍然對 GI 有

很好的保護力。JEV 雖有多種基因型存在，但認為都屬於同一種血清型，所以雖然目前所有的 JEV 疫苗株都屬於 GIII，但對 GI 感染仍有良好的保護力。台灣除了已存在原有的病毒外，每年仍有境外病毒不斷引入，故仍應持續監測 JEV 基因型之分布及病毒的演變並觀察與疫苗保護力的關係。

2015 年截至目前為止共有 4 例境外移入屈公病病例，來源國家為印尼(3 例)及菲律賓(1 例)，病毒基因型均屬於 Asian genotype。從 2005 年監測至今，並未發現有屈公病的本土流行。

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，實施完整的病媒性傳染病監測及檢驗是十分重要的。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，減少病毒的境外移入，並實施確定病例的擴大疫調及接觸者採檢，以檢驗出無症狀、未就醫及未通報的登革熱病例，及早發現指標病例及病毒來源，實施及時的防疫措施。

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，實施主動監測，清除蚊蟲孳生源仍為防治登革熱最主要的方法。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，故登革熱易在人口密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約 40% 境外移入登革熱病例，但仍有許多境外移入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。所以登革熱的主動監測及醫師的早期通報，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。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

2015年1-11月間至少有6株登革病毒(一株DENV-1,四株DENV-2及一株DENV-3)在台灣流行。高雄市在1-6月延續去年DENV-1的流行,但至7-8月,DENV-2台南市流行病毒株也傳播至高雄市成為主要的流行病毒株。台南市則自5月開始出現流行,至9月到達高峰,流行病毒株為DENV-2,來自印尼。近年來東南亞登革熱仍盛行,應持續進行登革熱病例的主動監測,及早發現登革病毒,阻斷人-蚊-人的傳播,並加強防治工作,降低流行的幅度,避免登革熱在台灣本土化,減少登革熱重症的發生率。

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,近年來台灣的病毒株已由GIII轉變成GI病毒株。在2015年的監測中,全台灣北、中、南及東部均為GI病毒株,其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.

**The distribution of imported dengue viruses in 2015
(2015/01/01-2015/10/27)**

Country	Case	Fever screening	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Subtotal
Indonesia	77	32	15(13)	18(8)	15(10)	2(1)	50(30)
Malaysia	40	20	16(11)	10(10)	3(1)	-	29(12)
Philippines	38	15	5(5)	11(8)	4(2)	6(4)	26(8)
Vietnam	34	14	14(11)	10(3)	-	2(1)	26(7)
Thailand	32	12	3(3)	4(4)	7(4)	5(0)	19(3)
Myanmar	21	5	4(3)	5(1)	-	3(3)	12(4)
Singapore	8	4	3(2)	1(1)	1(1)	-	5(3)
Cambodia	7	2	1(1)	1(1)	1(0)	1(0)	4(1)
India	5	1	-	2(2)	-	-	2(0)
Brazil	4	1	3(0)	-	-	-	3(0)
Maldives	3	0	-	2(2)	-	-	2(1)
China	2	0	-	-	-	-	-
Costa Rica	1	1	1(1)	-	-	-	1(1)
Laos	1	1	1(1)	-	-	-	1(0)
Australia	1	1	-	-	-	-	-
South Africa	1	0	-	-	-	-	-
Total	275	109	66(51)	64(40)	31(18)	19(9)	180(118)

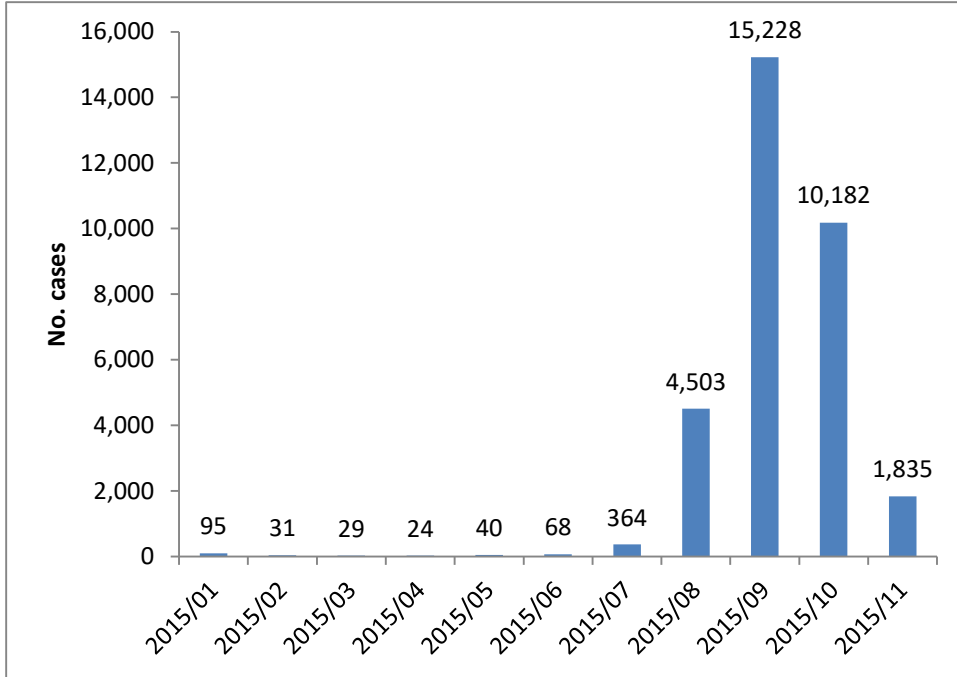
Table 2.

**Summary of genotype distributions of DENV strains isolated from imported cases in Taiwan, 2015
(2015/01/01-2015/10/27)**

Serotype	DENV-1			DENV-2		DENV-3			DENV-4		Total
	I	II	III	Cosmopolitan	Asian 1	I	II	III	I	II	
Indonesia	13	0	0	8	0	10	0	0	0	1	32
Malaysia	11	0	0	9	1	0	0	1	0	0	22
Philippines	0	5	0	8	0	2	0	0	0	4	19
Vietnam	11	0	0	0	3	0	0	0	1	0	15
Myanmar	3	0	0	0	1	0	0	0	3	0	7
Thailand	2	0	1	1	3	0	0	4	0	0	11
Singapore	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	4
Cambodia	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
India	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
Maldives	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
Costa Rica	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cambodia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Brazil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	43	5	3	31	9	12	0	6	4	5	118

Figure 1. 2015/01/01-2015/11/09 間，全國登革熱病例數(A)，高雄市及台南市登革熱病例數(B)，依月份分布。

A.



B.

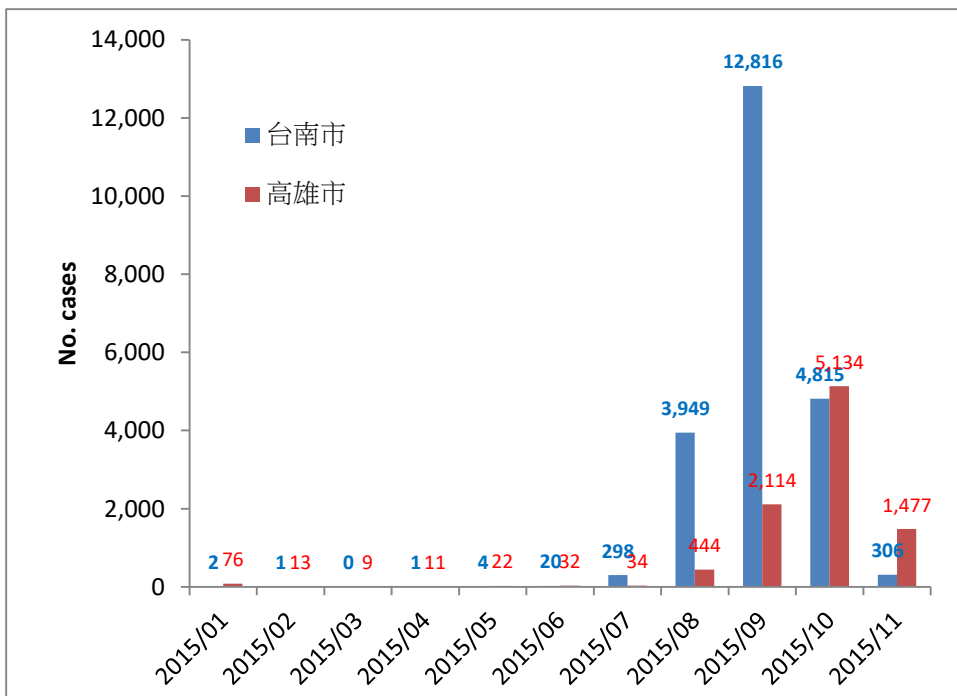


Figure 2. 2015 年登革病毒流行株及其分布。

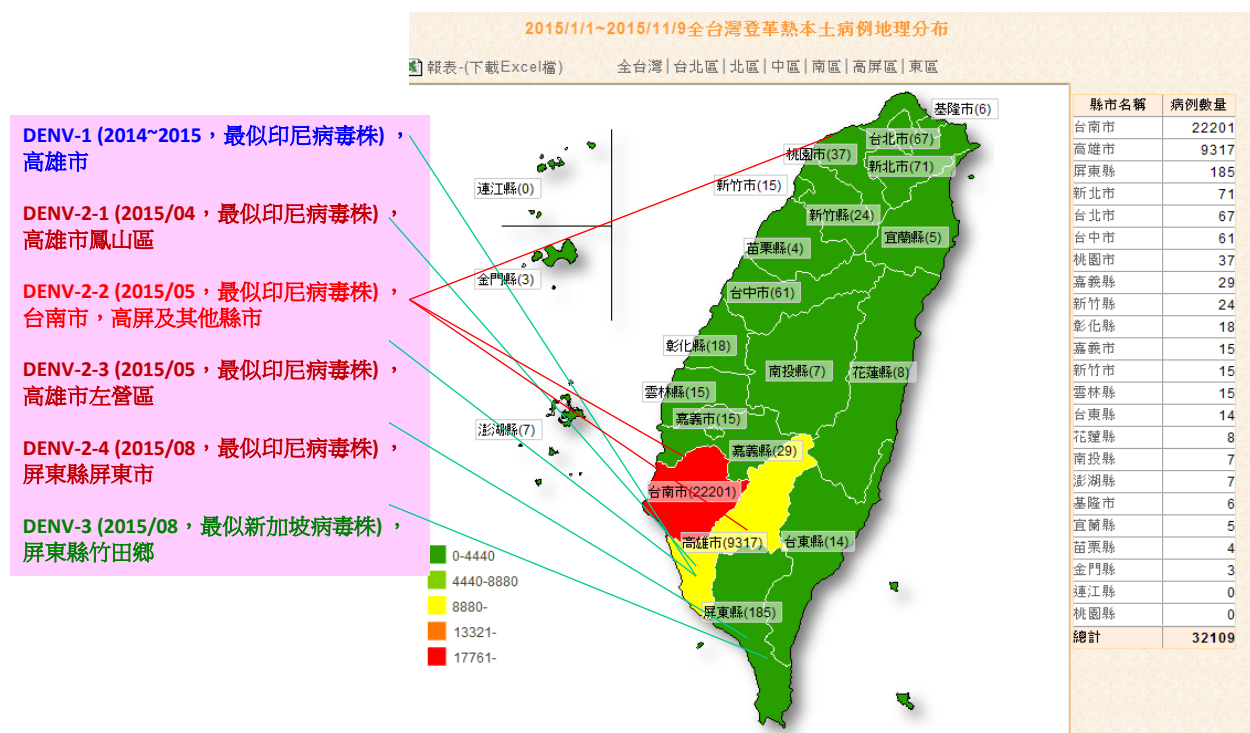


Figure 3. Phylogenetic tree of DENV-1. 2014-2015 epidemic DENV-1 strain in Taiwan

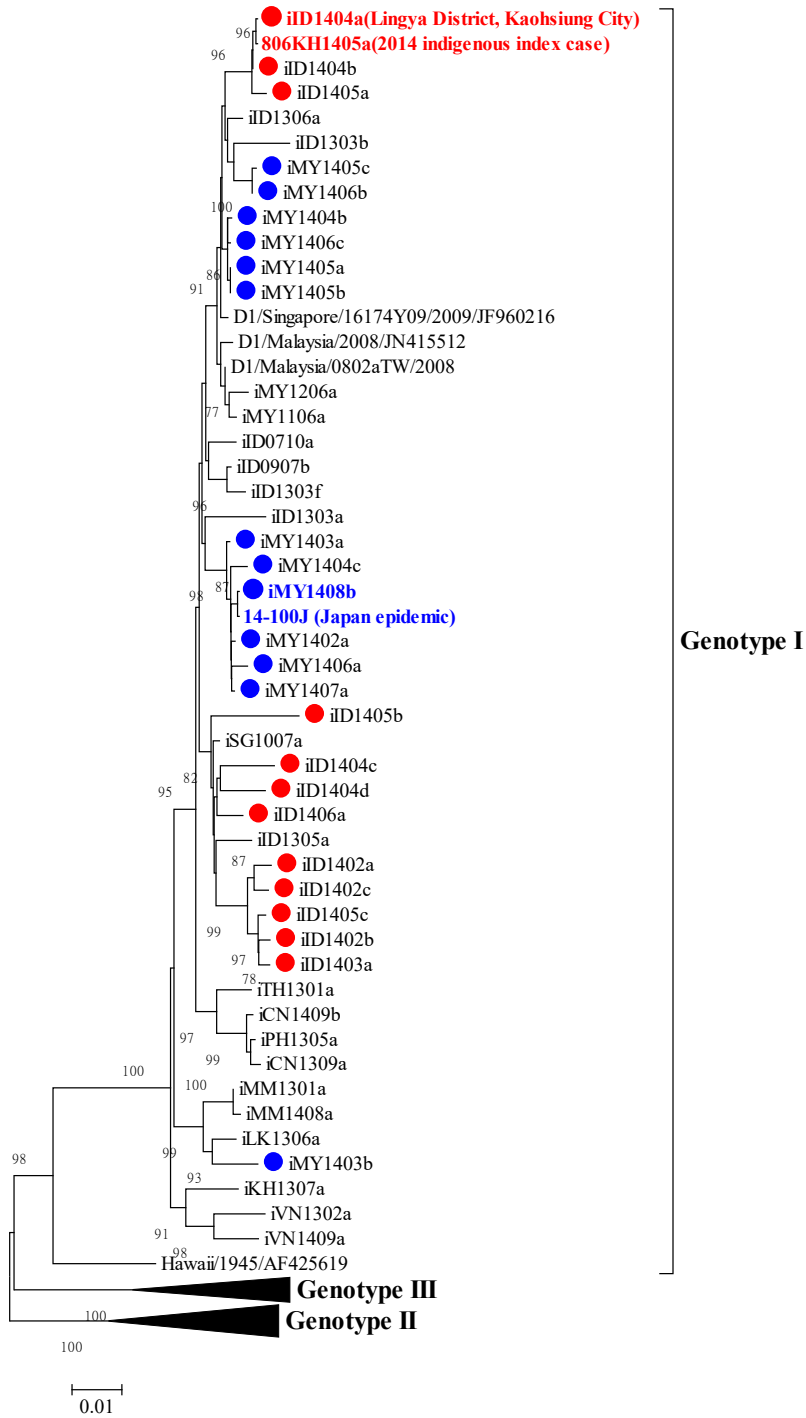


Figure 4. Phylogenetic tree of DENV-2. 2015 epidemic DENV-2 strains in Taiwan.

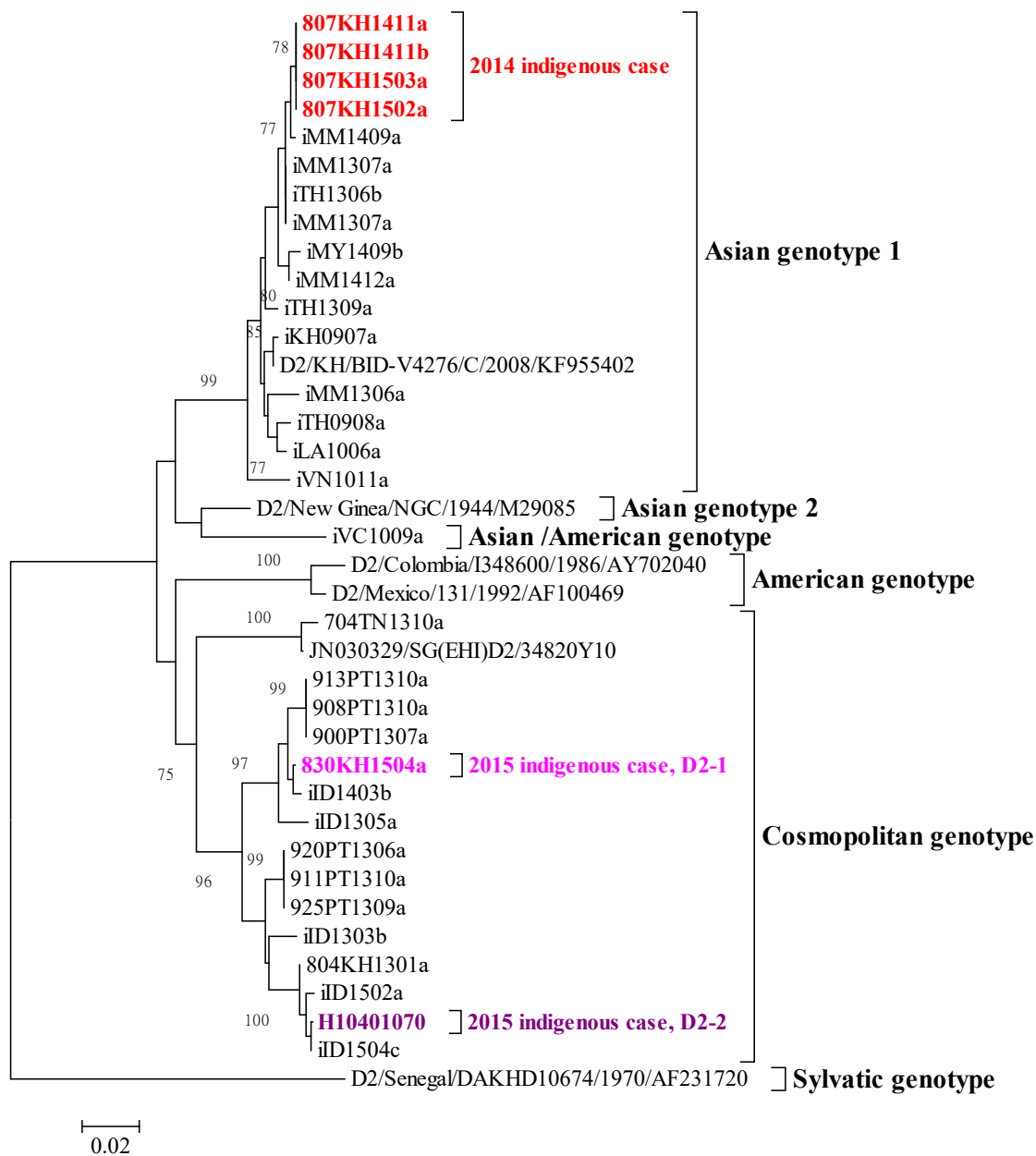
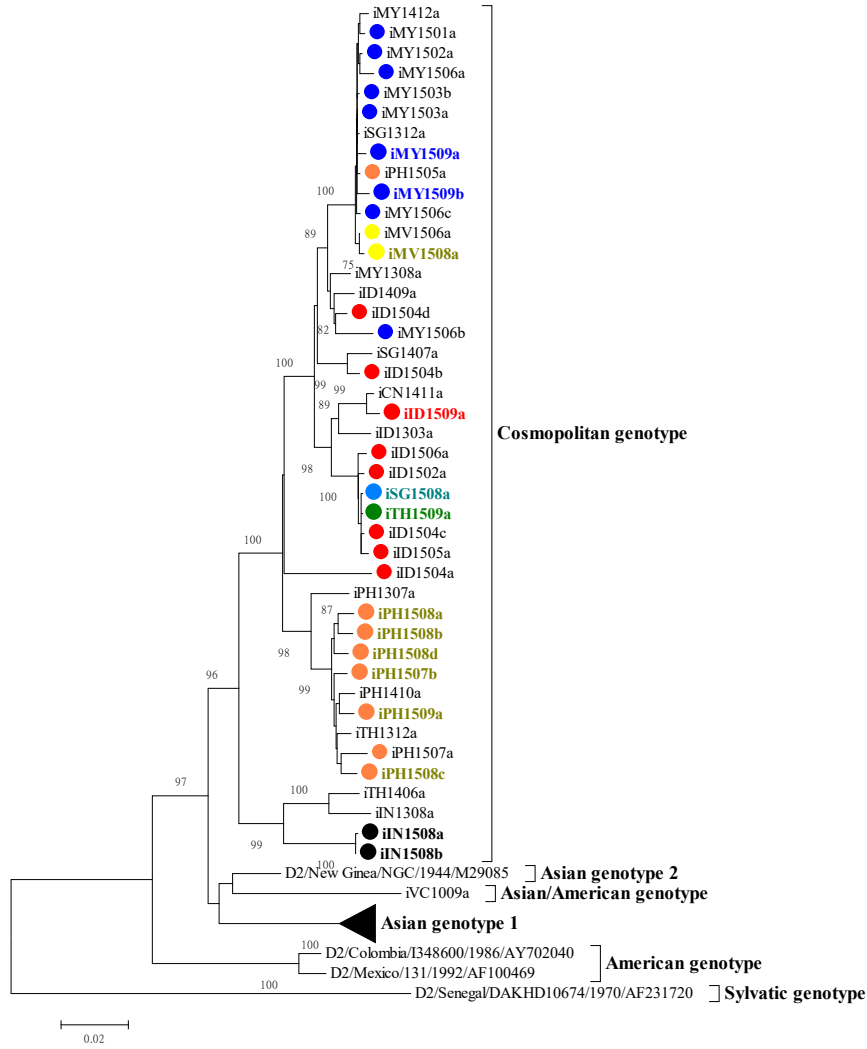


Figure 5. Phylogenetic tree of E gene of DENV-1. Imported DENV-1 strains.



Figure 6. Phylogenetic tree of E gene of DENV-2. Imported DENV-2 strains.



Asian 1 genotype

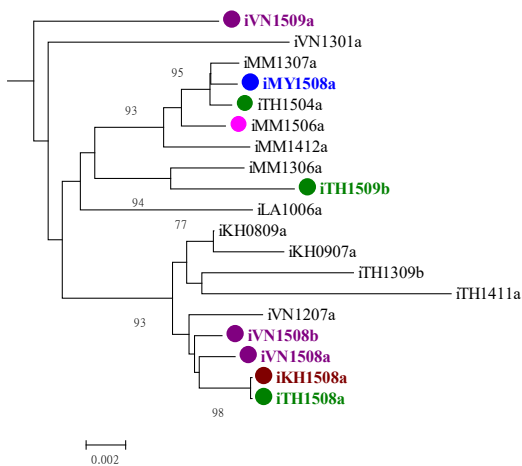
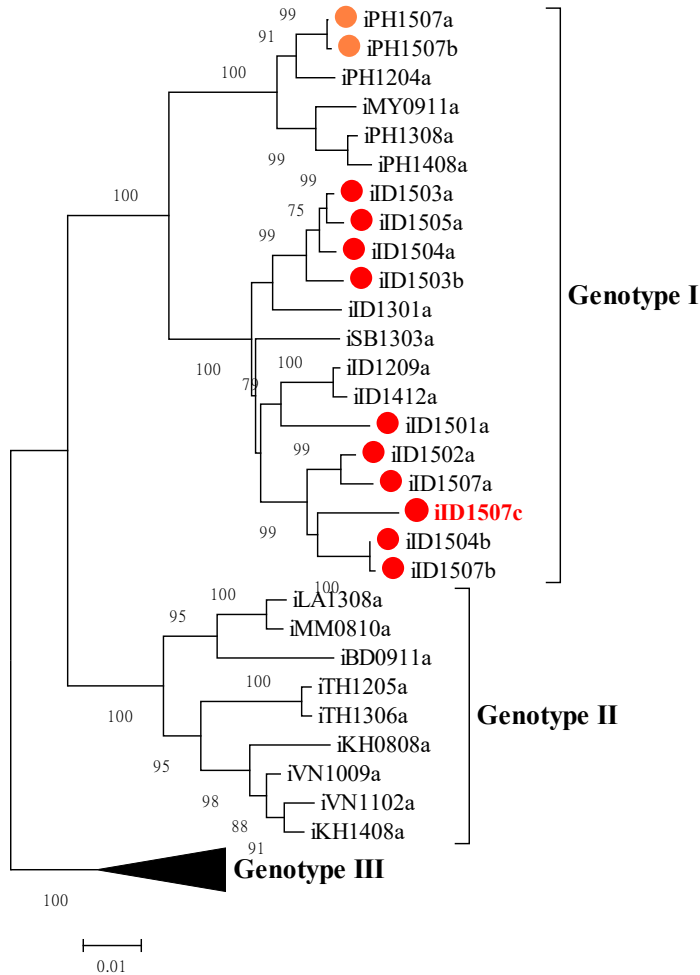


Figure 7. Phylogenetic tree of E gene of DENV-3. Imported DENV-3 strains.



Genotype III

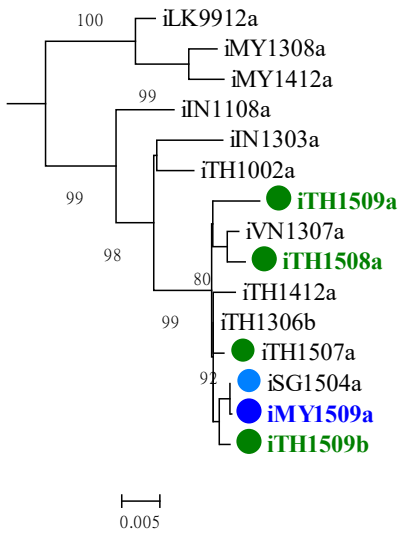
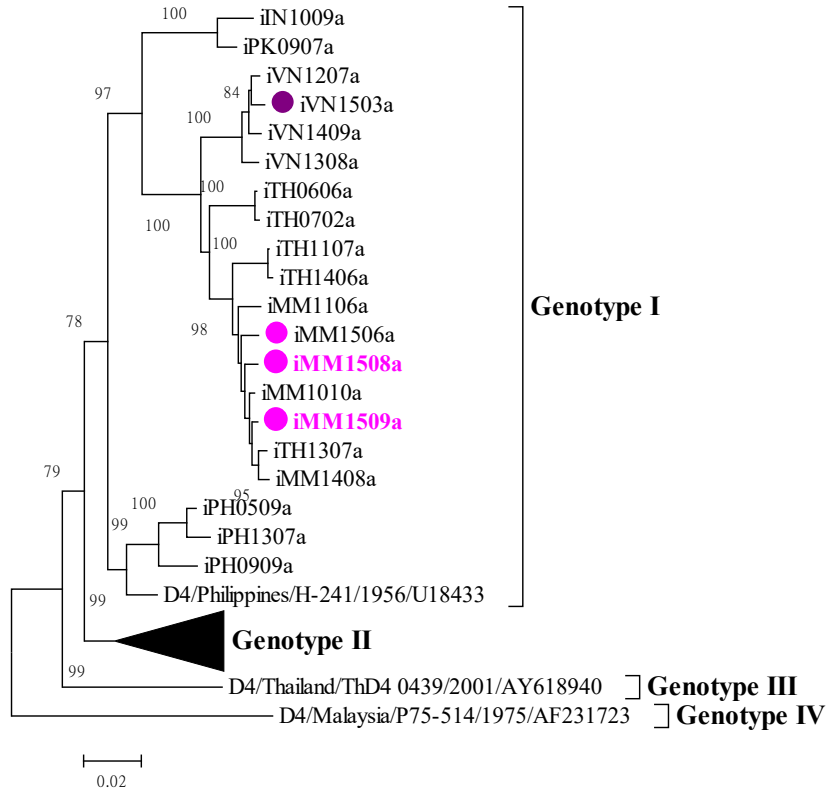


Figure 8. Phylogenetic tree of E gene of DENV-4. Imported DENV-4 strains.



Genotype II

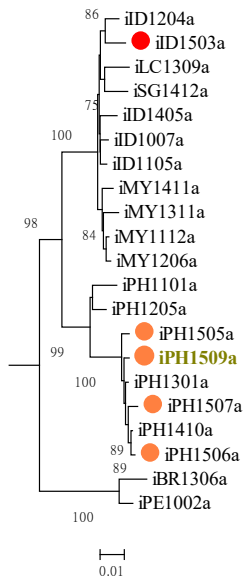
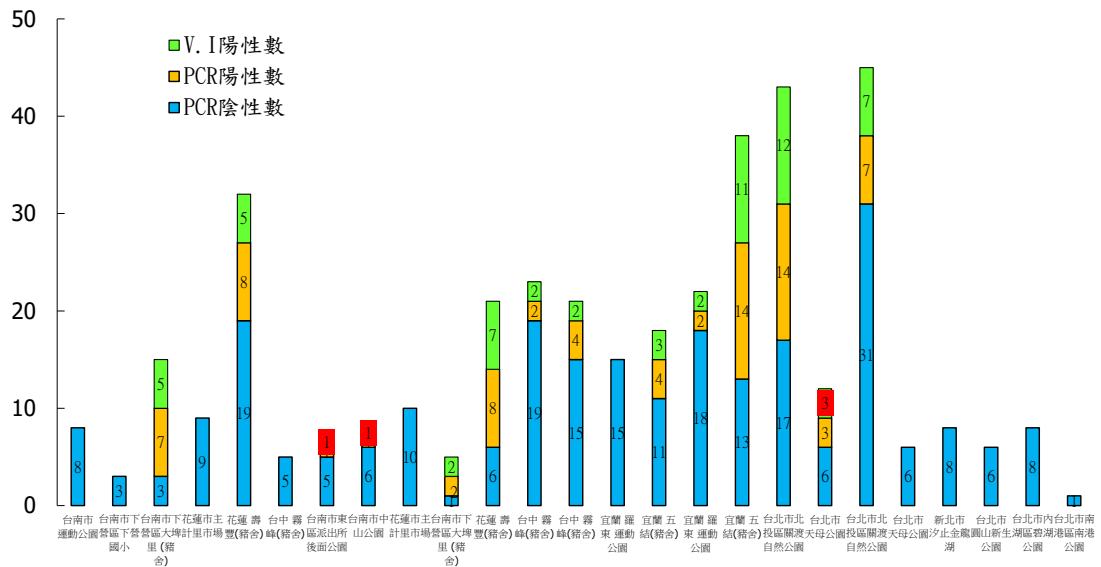


Figure 9. 病媒蚊採集時間、地點、RT-PCR 及病毒分離結果



2015		PCR陰性數	PCR陽性數	V.I陽性數	蚊子pool數
(0504)	台南市 運動公園	8			8
(0504)	台南市下營區下營國小	3			3
(0504)	台南市下營區大埤里(豬舍)	3	7	5	10
(0506)	花蓮市主計里市場	9			9
(0506)	花蓮 壽豐(豬舍)	19	8	5	27
(0513)	台中 霧峰(豬舍)	5			5
(0518)	台南市東區派出所後面公園	5	1	1	6
(0518)	台南市中山公園	6	1	1	7
(0520)	花蓮市主計里市場	10			10
(0518)	台南市下營區大埤里(豬舍)	1	2	2	3
(0520)	花蓮 壽豐(豬舍)	6	8	7	14
(0528)	台中 霧峰(豬舍)	19	4	2	21
(0602)	台中 霧峰(豬舍)	15			15
(0604)	宜蘭 羅東 運動公園	15			15
(0604)	宜蘭 五結(豬舍)	11	4	3	15
(0611)	宜蘭 羅東 運動公園	18	2	2	20
(0611)	宜蘭 五結(豬舍)	13	14	11	27
(0616)	台北市北投區關渡自然公園	17	14	12	31
(0616)	台北市 天母公園	6	3	3	9
(0623)	台北市北投區關渡自然公園	31	7	7	38
(0623)	台北市 天母公園	6			6
(0805)	新北市 汐止金龍湖	8			8
(0806)	台北市 圓山新生公園	6			6
(0910)	台北市內湖區碧湖公園	8			8
(0911)	台北市南港區南港公園	1			1
Total		249	77	63	326

Figure 10. Phylogenetic tree of E gene of JEV strains.

